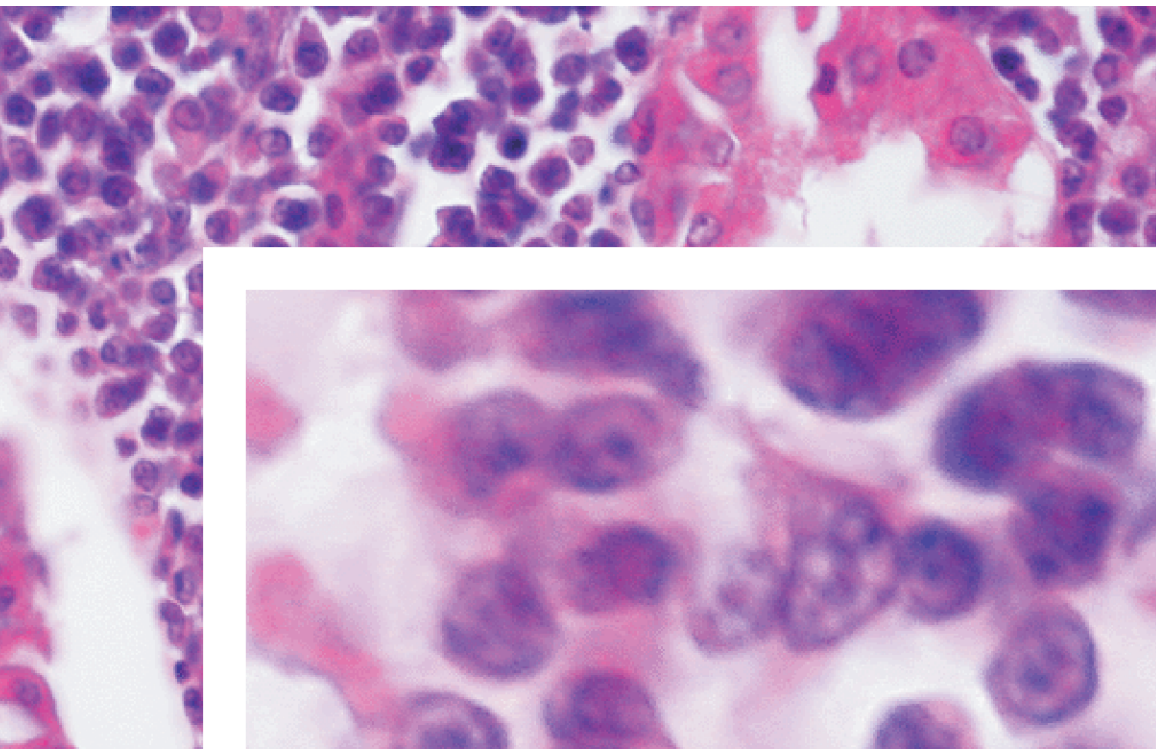


ENTWICKLUNG EINER PCR-GESTÜTZTEN KLONALITÄTS- DIAGNOSTIK BEI B-ZELL-LYMPHOMEN DER KATZE

MANFRED ALEXANDER HENRICH



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**ENTWICKLUNG EINER PCR-GESTÜTZTEN
KLONALITÄTSDIAGNOSTIK BEI B-ZELL-LYMPHOMEN
DER KATZE**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MANFRED ALEXANDER HENRICH

Tierarzt aus Karlsruhe

Gießen 2008

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. A. Moritz

Tag der Disputation: 6. Mai 2008

Meinen Eltern und Estelle

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1	Neoplastische Proliferationen von Blutzellen	2
2.2	Einteilung der lymphatischen Proliferationen bei der Katze	2
2.2.1	Makroskopische Einteilung.....	2
2.2.2	Histologische Einteilung	3
2.2.2.1	WHO-Klassifikation hämatopoetischer Tumoren der Haustiere	3
2.2.2.2	WHO-Klassifikation der in der Arbeit verwendeten Neoplasien.....	5
2.2.2.2.1	B-Zell-Lymphome.....	5
2.2.2.2.1.1	Follikelzentrums-Lymphom Typ II.....	5
2.2.2.2.1.2	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	5
2.2.2.2.2	T-Zell-Lymphome	6
2.2.2.2.2.1	Intestinales T-Zell-Lymphom	6
2.2.2.2.2.2	Lymphoblastisches T-Zell-Lymphom.....	6
2.3	Ätiologie lymphatischer Proliferationen bei der Katze.....	6
2.3.1	Das Feline Leukämievirus (FeLV).....	6
2.3.1.1	Vorkommen bei lymphatischen Proliferationen.....	6
2.3.1.2	Tumorphagenese	7
2.3.2	Das Feline Immundefizienz Virus (FIV).....	8
2.4	Limitierung der histologischen Diagnostik lymphatischer Proliferationen	8
2.5	Klonalitätsanalyse	9
2.5.1	Untersuchung der Inaktivierung von X-Chromosomen	9
2.5.2	Nachweis somatischer Mutationen.....	10
2.5.3	Analyse viraler Integrationen	11
2.5.4	Lymphozytenanalyse.....	11
2.5.4.1	Molekularbiologische Grundlagen	11
2.5.4.1.1	B-Zellen.....	11
2.5.4.1.2	Aufbau des B-Zell-Rezeptors	12
2.5.4.1.3	V(D)J-Rekombination	13
2.5.4.1.4	Mechanismen zur Erhöhung der Antikörperdiversität	16
2.5.4.1.4.1	Kombinatorische Diversität.....	16
2.5.4.1.4.2	Junktionale Diversität.....	16
2.5.4.1.4.3	Somatische Hypermutation	18
2.5.5	Diagnostische Anwendung.....	19
2.5.5.1	Humanmedizin	19
2.5.5.1.1	Southern Blotting	19
2.5.5.1.2	PCR	20
2.5.5.1.2.1	B-Zell-Neoplasien	21
2.5.5.2	Veterinärmedizin	22
2.5.5.2.1	Hund	22
2.5.5.2.2	Katze.....	22
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Vorbemerkung.....	24
3.2	Biologisches Material.....	26
3.2.1	Histologische und Immunhistologische Diagnose der verwendeten Proben ...	28
3.3	Isolierung von Nukleinsäuren	29
3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNS aus unfixiertem Gewebe mittels Purescript® RNA Purification Kit	29
3.3.2	Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNS mittels Oligotex® mRNA Kit.....	30

3.3.3	Isolierung von DNS mittels Puregene® DNA Purification Kit	31
3.3.3.1	Isolierung von DNS aus unfixiertem Gewebe.....	31
3.3.4	Isolierung von DNS aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe.....	32
3.3.4.1	Isolierung mit dem Puregene® DNA Purification Kit.....	32
3.3.4.2	Isolierung durch Hitzebehandlung, Chelex 100 und Chloroformextraktion....	34
3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
3.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	35
3.4.2	Elektrophoretische Integritäts- und Konzentrationsbestimmung	35
3.5	Amplifikation von Nukleinsäuren.....	36
3.5.1	Verwendete Oligonukleotide.....	36
3.5.2	PCR-Verfahren.....	38
3.5.2.1	Primertest	38
3.5.2.1.1	Ergebniskontrolle	39
3.5.2.2	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	40
3.5.2.3	PCR mit dem SMART™ RACE Amplification Kit.....	41
3.5.2.4	CapFishing™ Technik.....	43
3.5.2.5	Amplifikation der cDNA mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase.	45
3.5.2.5.1	Leader-PCR.....	46
3.6	Aufreinigung von DNS	46
3.7	Klonierung von PCR-Produkten	48
3.7.1	AccepTor™ Vector Kit	48
3.7.2	Agar-Nährböden und Flüssigkulturmedien	48
3.7.3	dATP „Tailing“ der PCR-Produkte.....	49
3.7.4	Vorbereitung der DNS für die Klonierung.....	49
3.7.5	Ligation und Transformation	49
3.7.6	Kolonie-PCR	50
3.7.7	Anzucht geeigneter Kolonien und Plasmidpräparation.....	51
3.7.8	Biologische Sicherheit.....	53
3.7.9	Kontrolle der Plasmide.....	53
3.8	Sequenzierung und Auswertung der Sequenzierungsergebnisse	54
3.9	Test des diagnostischen Primersystems	54
3.9.1	Überprüfung der DNS-Qualität.....	54
3.9.2	Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des felines Immunglobulins....	55
3.9.2.1	QIAGEN® Multiplex PCR Kit	57
3.9.3	Ergebniskontrolle (SDS-PAGE)	58
3.9.4	Heteroduplexanalyse	60
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Analyse der schweren Kette des felines Immunglobulins	61
4.1.1	Verifizierung der veröffentlichten Sequenz der C-Region der schweren Kette des felines IgMs	62
4.1.2	Analyse der weiter in Richtung 5'-Ende gelegenen Sequenzen.....	62
4.1.2.1	SMART™ RACE-Technik	62
4.1.2.2	Leader-PCR.....	64
4.1.2.3	CapFishing™ -Technik	66
4.2	Entwicklung der Diagnostikprimer	67
4.2.1	Sense-Primer	67
4.2.2	Antisense-Primer	68
4.2.3	Überprüfung der Primer	71
4.3	Etablierung des Diagnostik-Systems.....	71

4.3.1	Elektrophorese.....	71
4.3.2	Isolierung der Proben-DNS	72
4.3.2.1	Frischmaterial.....	72
4.3.2.2	Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe	72
4.3.3	Amplifikation des CDR3.....	73
4.3.4	Heteroduplexanalyse	73
4.3.5	Ergebnisse der mit dem Diagnostiksystem untersuchten Proben.....	74
4.3.5.1	B-Zell-Lymphome.....	74
4.3.5.1.1	Fälle 3020/92 und 3597/06.....	74
4.3.5.1.2	Fälle T383/05 und T1528/07	76
4.3.5.1.3	Fälle 2253/97 und 2047/95	79
4.3.5.1.4	Fälle T7795/05 und 940/97	82
4.3.5.1.5	Fälle T7192/06 und S1003/04	85
4.3.5.2	Lymphatische Hyperplasien	87
4.3.5.2.1	Fälle T847/05 und T878/05.....	87
4.3.5.2.2	Fälle T630/05 und T273/05	89
4.3.5.2.3	Fälle T3746/05 und T6950/05	91
4.3.5.2.4	Fälle T7426/06 und S1592/04	93
4.3.5.2.5	Fälle S345/07 und S348/07	95
4.3.5.3	T-Zell-Lymphome	96
4.3.5.3.1	Fälle 1883/94 und S1017/05	96
4.3.5.3.2	Fälle 2155/90 und 280/92.....	97
4.3.5.3.3	Fälle 93/93 und 1989/98.....	98
4.3.5.3.4	Fälle 1379/99 und 1945/90.....	99
4.3.5.3.5	Fälle 217/94 und 15/96.....	100
4.3.6	Amplifikation der VH1-Positivkontrolle in getrennten Ansätzen.....	101
5	DISKUSSION	102
5.1	Analyse der schweren Kette des feline Immunglobulins	102
5.1.1	Analyse der Gene der schweren Kette mit der SMART™ RACE-Technik ...	102
5.1.2	Analyse des NCBI Trace Archivs	103
5.1.3	Leader-PCR.....	104
5.1.4	Analyse mit der CapFishing™ Technik	105
5.2	Diagnostikprimer.....	105
5.2.1.1	Vergleich mit dem bestehenden Diagnostiksystem	106
5.3	Horizontale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	107
5.4	DNS-Isolierung und Qualität der gewonnenen DNS	108
5.5	Limitierung der Klonalitätsanalyse von B-Zell-Lymphomen mit der PCR ...	109
5.5.1	Falsch negative Resultate	109
5.5.2	Falsch polyklonale Resultate.....	110
5.5.3	Falsch klonale Resultate.....	111
5.5.3.1	Pseudomonoklonal	111
5.5.3.2	Oligoklonal.....	112
5.6	Kriterien für die Interpretation der Elektrophorese-Ergebnisse	112
5.7	Heteroduplexanalyse	113
5.8	Aussagekraft der Elektrophorese-Resultate	114
5.9	Analyse der mit dem Diagnostiksystem amplifizierten Proben	114
5.9.1	Duplizierung der FR1-spezifischen Bande der VH1-Positivkontrolle.....	114
5.9.2	Diskussion der Ergebnisse der mit dem Primersystem untersuchten Proben ..	115
5.9.2.1	B-Zell-Lymphome.....	115
5.9.2.1.1	Fall 3020/93.....	115

5.9.2.1.2	Fall 3597/06.....	115
5.9.2.1.3	Fall T383/05	116
5.9.2.1.4	Fall T1528/07	116
5.9.2.1.5	Fall 2253/97.....	118
5.9.2.1.6	Fall 2074/95.....	118
5.9.2.1.7	Fall T7795/05	119
5.9.2.1.8	Fall 940/97.....	119
5.9.2.1.9	Fall T7192/06	119
5.9.2.1.10	Fall S1003/04	120
5.9.2.1.11	Zusammenfassung der untersuchten B-Zell-Lymphome	120
5.9.3	Lymphatische Hyperplasien.....	121
5.9.4	T-Zell-Lymphome	121
5.9.5	Beurteilung des diagnostischen Systems.....	122
6	ZUSAMMENFASSUNG	123
7	LITERATURVERZEICHNIS	125
8	ANHANG	135
8.1	Verwendete Längenstandards	135
8.1.1	pUC19/MspI.....	135
8.1.2	MF	136
8.2	Gießblock für die horizontale SDS-PAGE.....	136
8.3	Tagebuchnummern, Art der Fixierung und DNS-Isolierung	137
8.4	Tagebuchnummern, Rasse, Alter und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe	141
8.5	Histologie der mit dem Diagnostiksystem untersuchten B-Zell-Lymphome.	144
8.6	Histologie der Probe 1883/94 (T-Zell-Lymphom).....	154
8.7	Histologie der Probe 878/05 (Lymphatische Hyperplasie)	155
8.8	Lokalisierung von Leaderregion, SMART II TM Oligonukleotid, V-Region, CDR3 und C-Region in den Inserts.....	156
8.9	Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene.....	158
8.10	Veröffentlichter Teil der C-Region der schweren Kette des feline IgM (Cho et al., 1998).....	162
8.11	Verzeichnis der Klone (Sequenzen der Inserts)	162
8.12	Sequenz der bei der Untersuchung von Fall T1528/07 aufgetretenen Nebenbande	169
8.13	Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme, Kits und Antikörper	170
8.14	Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel	172
8.15	Lösungen und Puffer	175
8.15.1	PCR	175
8.15.1.1	DEPC-Wasser – RNase-freies Wasser	175
8.15.2	Elektrophorese.....	175
8.15.2.1	10 × TBE-Puffer	175
8.15.2.2	40 × TAE-Puffer.....	175
8.15.2.3	0,5 × T-Puffer	175
8.15.2.4	15%ige Ficoll [®] -Lösung zum Beladen der Geltaschen	176
8.15.2.5	2%ige und 3 %ige Agarosegele	176
8.15.2.6	Glasplatten silanisieren	176
8.15.3	Klonierung.....	176
8.15.3.1	LB Medium	176
8.15.3.2	LB Agar.....	177

9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	178
----------	-----------------------------------	------------

1 **Einleitung**

„Wer mit Katzen spielt, darf die Kratzer nicht scheuen“

(Ägyptisches Sprichwort)

Bei der Identifizierung lymphatischer Neoplasien mit Hilfe der Histopathologie stellt sich öfters das Problem, neoplastische Lymphozyten von reaktiven Lymphozyten unterscheiden zu müssen. So können infiltrierende Lymphozyten oder proliferierendes lymphatisches Gewebe als Entzündungsreaktion in manchen Fällen den Zellen einer echten Neoplasie so ähnlich erscheinen (Mooney et al., 1987), dass eine eindeutige Abgrenzbarkeit durch den Untersucher ohne weitere diagnostische Maßnahmen nicht möglich ist.

Hierbei hilft eine Eigenschaft, welche neoplastische Lymphozyten von reaktiven unterscheidet. Es handelt sich dabei um die Monoklonalität lymphatischer Neoplasien. Dies bedeutet nichts anderes, als dass alle Zellen eines malignen lymphatischen Tumors durch Teilung aus einer entarteten Ausgangszelle hervorgegangen sind (Wainscoat und Fey, 1990).

Ziel dieser Arbeit war es, ein diagnostisches System auf Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion zu entwickeln, welches die Monoklonalität von feline B-Zell-Lymphomen zur Abgrenzung von reaktiven lymphozytären Proliferationen ausnutzt.

2 Literaturübersicht

2.1 Neoplastische Proliferationen von Blutzellen

Die deutschsprachige Veterinärmedizin spricht bei neoplastischen Proliferationen weißer Blutzellen traditionell von Leukosen (Ellermann und Bang, 1908). Dieser Begriff wurde ursprünglich zur Abgrenzung der soliden Tumoren von den Leukämien gewählt.

Diese systemischen Tumorerkrankungen jugendlicher oder reifer Blutzellen können je nach dem betroffenen Zelltyp in lymphatische und myeloische Proliferationen unterschieden werden. Dies entspricht der grundsätzlichen Einteilung der Leukozyten in die myeloische und die lymphatische Linie, die beide auf eine gemeinsame Vorläuferzelle zurück gehen (Lu et al., 2002).

Unter den neoplastischen Erkrankungen der Katze spielt die Gruppe der lymphatischen Proliferationen, die Lymphome, zahlenmäßig eine herausragende Rolle. Hardy (1981) beschreibt, dass bis zu 50 % aller Neoplasien der Katze hämoproliferative Erkrankungen sind. Andere Studien ergaben, dass von den bei seziierten Katzen gefundenen neoplastischen Proliferationen Leukosen über 50 % ausmachen, wobei es sich bei über 90 % um lymphatische Leukosen handelt (Reinacher, 1997; Reinacher und Theilen, 1987; Reinacher et al., 1995).

2.2 Einteilung der lymphatischen Proliferationen bei der Katze

Die lymphatischen Proliferationen können in solide Tumoren, die als maligne Lymphome bzw. Lymphosarkome bezeichnet werden, in lymphatische Leukämien, Tumoren der immunglobulinbildenden Zellen und das Thymom eingeteilt werden (Jarrett und Mackey, 1974).

2.2.1 Makroskopische Einteilung

Makroskopisch werden die malignen Lymphome der Katze, angelehnt an die WHO-Klassifikation von 1974 für die hämatopoetischen Tumoren bei Haustieren, anhand ihrer anatomischen Verteilung in die multizentrische Form, die intestinale Form, die Thymusform (mediastinale Form) und andere Formen eingeteilt (Jarrett und Mackey, 1974).

2.2.2 Histologische Einteilung

Die Humanmedizin hat zur histologischen Unterteilung der Non-Hodgkin-Lymphome verschiedene Klassifikationsmodelle entwickelt. Übernommen zur Einteilung der malignen Lymphome der Katze wurden vor allem die Rappaport-Klassifizierung (Valli et al., 1981), die National Cancer Institute Working Formulation (Day, 1995; Gabor et al., 1999; Valli et al., 2000) und die Kiel-Klassifizierung (Callanan et al., 1996). Die letzteren versuchen, eine sichere Aussage über die Prognose des Patienten zu machen, indem ein Zusammenhang zwischen dem biologischen Verhalten des Tumors und seinem Phänotyp hergestellt wird. Diesem Ziel dient die Unterscheidung in niedrig-, intermediär- und hochmaligne Formen. Die Berücksichtigung des Genotyps und des Immunphänotyps neben dem histologischen Befund wird bei der neueren REAL-Klassifizierung (Harris et al., 1994) angewandt.

2.2.2.1 WHO-Klassifikation hämatopoetischer Tumoren der Haustiere

Als aktueller internationaler Standard zur histologischen Klassifikation der hämatopoetischen Proliferationen bei Haustieren und damit auch der lymphatischen Proliferationen bei der Katze gilt jedoch die WHO-Klassifikation der hämatopoetischen Tumoren der Haustiere von 2002 (Valli et al., 2002), welche die Tumoren des lymphoiden Systems wie folgt einteilt:

WHO-Klassifikation der hämatopoetischen Tumoren der Haustiere
(Auszug: Tumoren des lymphoiden Systems)

1. B-Cell Lymphoid Neoplasms

- 1.1 Precursor B-cell neoplasms
 - 1.1.1 B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma
- 1.2 Mature B-cell neoplasms
 - 1.2.1 B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma
 - 1.2.2 B-cell lymphocytic lymphoma intermediate type (LLI)
 - 1.2.3 Lymphoplasmacytic lymphoma (LPL)
 - 1.2.4 Follicular lymphomas
 - 1.2.4.1 Mantle cell lymphoma (MCL)
 - 1.2.4.2 Follicular center cell lymphoma I
 - 1.2.4.3 Follicular center cell lymphoma II
 - 1.2.4.4 Follicular center cell lymphoma III
 - 1.2.4.5 Nodal marginal zone lymphoma
 - 1.2.4.6 Splenic marginal zone lymphoma
 - 1.2.5 Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
 - 1.2.6 Hairy cell leukemia
 - 1.2.7 Plasmacytic tumors
 - 1.2.7.1 Indolent plasmacytoma
 - 1.2.7.2 Anaplastic plasmacytoma
 - 1.2.7.3 Plasma cell myeloma
 - 1.2.8 Large B-cell lymphomas
 - 1.2.8.1 T-cell-rich B-cell lymphoma
 - 1.2.8.2 Large cell immunoblastic lymphoma
 - 1.2.8.3 Diffuse large B-cell (noncleaved, cleaved) lymphoma
 - 1.2.8.4 Thymic B-cell lymphoma (mediastinal B)
 - 1.2.8.5 Intravascular large B-cell lymphoma
 - 1.2.9 Burkitt-type lymphoma
 - 1.2.9.1 High-grade B-cell lymphoma, Burkitt-like

2. T-Cell and NK-Cell Lymphoid Neoplasms

- 2.1 Precursor T-cell neoplasms
 - 2.1.1 T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma
- 2.2 Mature T-cell and NK neoplasms
 - 2.2.1 Large granular lymphoproliferative disorders (LGL)
 - 2.2.1.1 T-cell chronic lymphocytic leukemia
 - 2.2.1.2 T-cell LGL lymphoma/leukemia
 - 2.2.1.3 NK-cell chronic lymphocytic leukemia
 - 2.2.2 Cutaneous T-cell neoplasms
 - 2.2.2.1 Cutaneous epitheliotropic lymphoma (CEL)
 - 2.2.2.1.1 CEL, mycosis fungoides type
 - 2.2.2.1.2 CEL, pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp) type
 - 2.2.2.2 Cutaneous nonepitheliotropic lymphoma
 - 2.2.3 Extranodal/peripheral T-cell lymphoma (PTCL)
 - 2.2.3.1 PTCL, mixed lymphoid type
 - 2.2.3.2 PTCL, mixed inflammatory type
 - 2.2.4 Adult T-cell like lymphoma/leukemia
 - 2.2.5 Angioimmunoblastic lymphoma (AILD)
 - 2.2.6 Angiotropic lymphoma
 - 2.2.6.1 Angiocentric lymphoma
 - 2.2.6.2 Angioinvasive lymphoma
 - 2.2.7 Intestinal T-cell lymphoma
 - 2.2.8 Anaplastic large cell lymphoma (ALCL)

3 Miscellaneous Tumors

- 3.1 Mast cell tumor
- 3.2 Hodgkin-like lymphoma
- 3.3 Thymoma
- 3.4 Thymic carcinoma (malignant thymoma)
- 3.5 Myelolipoma
- 3.6 Malignant fibrous histiocytoma

4 Benign Lymphoid Proliferations

- 4.1 Follicular lymphoid hyperplasia
- 4.2 Atypical follicular lymphoid hyperplasia

Diese Klassifikation teilt die lymphatischen Tumoren zunächst in B-Zell Neoplasien, T- und NK-Zell Neoplasien, sonstige Tumoren und gutartige lymphoide Proliferationen ein.

Die weitere Klassifikation der einzelnen Gruppen orientiert sich an zytologischen Faktoren wie Zellgröße, Kernform, -größe und -zahl, Verteilung des Chromatins, Kern-Zytoplasma-Verhältnis oder der Kernplatzierung. Weitere Einteilungskriterien sind die Lage des Tumors bzw. der Ursprungszelle im Gewebe und die Architektur des Tumors.

Die Kenntnis des Zelltyps, also lymphoblastisch, lymphozytär, plasmazytär, immunoblastisch, B- oder T-Zellen, hat eine große Bedeutung, da die Prognose der verschiedenen Lymphome unterschiedlich ist. So haben beim Menschen (Gisselbrecht et al., 1998; Melnyk et al., 1997) und beim Hund z.B. T-Zell-Lymphome eine schlechtere Prognose als B-Zell-Lymphome (Link und Hirschberger, 2000).

Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung des Immunophänotyps bei der Katze zeigten allerdings, dass hier keine Vorhersage der Prognose aufgrund der Zuordnung zum T-Zell-Phänotyp möglich war (Patterson-Kane et al., 2004; Vail et al., 1998).

2.2.2.2 WHO-Klassifikation der in der Arbeit verwendeten Neoplasien

Die nachfolgend aufgeführten Beschreibungen der in der Arbeit verwendeten Neoplasien entstammen dem Originaltext der WHO-Klassifikation der hämatopoetischen Tumoren der Haustiere von 2002 (Valli et al., 2002).

2.2.2.2.1 B-Zell-Lymphome

2.2.2.2.1.1 Follikelzentrums-Lymphom Typ II

Die follikulären Lymphome stammen von den Germinalzentren der Lymphknoten und der Milz ab. Sie sind durch eine follikuläre Architektur und einen nach außen ausdünnenden Saum von Mantelzellen gekennzeichnet.

Das Follikelzentrums-Lymphom Typ II ist ein sich langsam entwickelnder Tumor mit follikulärer Architektur. Er besteht aus kleinen reifen Zellen mit gekerbten Kernmembranen (sog. *cleaved cells*, bzw. *centrocytes*) und großen Zellen mit oder ohne gekerbten Zellkern (auch als *centroblasts* bezeichnet). Mitosen können in fast allen Follikeln beobachtet werden.

2.2.2.2.1.2 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

Großzellige B-Zell-Lymphome sind Tumoren mit diffuser Architektur, die aus großen B-Zellen bestehen.

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom ist mittelgradig aggressiv und besteht aus einer relativ einheitlichen Population von großen lymphoiden Zellen. Die Zellkerne sind teilweise

blasig mit verzweigtem Chromatin und zwei oder drei prominenten Nukleoli, welche typischerweise der Kernmembran anliegen.

2.2.2.2.2 T-Zell-Lymphome

2.2.2.2.2.1 Intestinales T-Zell-Lymphom

Dies sind langsam wachsende Tumoren des Darmtraktes, die wahrscheinlich aus chronischen Darmentzündungen (inflammatory bowel disease, IBD) hervorgehen. Sie bestehen aus einer starken Infiltration mit kleinen, dunkel gefärbten T-Lymphozyten mit irregulärer Kernform. Die Zellen dringen in das Darmepithel ein, wobei kleine Nester im Epithel gefunden werden können. Oft finden sich fokale Ulzerationen in der Darmschleimhaut. Die Lamina propria ist unregelmäßig involviert. Ein Kennzeichen der malignen Transformation ist die uneinheitliche Beteiligung der Villi, wobei nicht betroffene Villi neben stark infiltrierten liegen können.

2.2.2.2.2.2 Lymphoblastisches T-Zell-Lymphom

Dies ist ein schnell wachsender Tumor aus T-Lymphoblasten, der das Knochenmark und/oder das periphere Gewebe in unterschiedlichem Grad betrifft. Die Zellen sind mittelgroß mit mittlerer Kerngröße. Der Tumor zeigt eine diffuse Architektur und eine hohe Mitoserate. Die Kerne sind rund oder haben flache Einziehungen („convoluted type“). Die Nukleoli sind klein und undeutlich oder fehlen.

2.3 Ätiologie lymphatischer Proliferationen bei der Katze

2.3.1 Das Feline Leukämievirus (FeLV)

Das feline Leukämievirus gehört zum Genus der Gammaretroviren (Mammalian Typ C-Retrovirus) der Familie *Retroviridae* (Murphy et al., 1999). Es ist ein behülltes Einzelstrang-RNS-Virus mit ikosaedrischem Kapsid.

2.3.1.1 Vorkommen bei lymphatischen Proliferationen

Einer kanadischen Studie von Jackson et al. (1996) zufolge waren 54 % der Lymphome FeLV-Antigen-positiv. In älteren Untersuchungen konnten bei bis zu 70 % der an hämatopoetischen Proliferationen erkrankten Katzen das feline Leukämievirus (FeLV) nachgewiesen werden konnte (Hardy, 1981). Neuere australische Studien zeigten, dass dort im Untersuchungszeitraum nur 2 % der untersuchten Katzen mit hämatopoetischen

Proliferationen FeLV-Antigen-positiv waren. Jedoch konnte mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) in 26 % der Tumoren FeLV-Provirus nachgewiesen werden (Gabor et al., 2001a). Australien hat jedoch eine wesentlich niedrigere Häufigkeit von FeLV-Infektionen, als Mitteleuropa und die USA (Schmidt et al., 1992; Shaw et al., 1990). Eine andere australische Studie mit 14 Tieren mit Lymphomen konnte dementsprechend keine FeLV-DNS feststellen (Wang et al., 2001).

Eine US-amerikanische Studie belegt mit nur 14,5 % FeLV-positiven Lymphomen im Untersuchungsmaterial des Zeitraums von 1983 bis 2003 eine deutlich geringere Zahl von FeLV-positiven Lymphomen in neuerer Zeit (Louwerens et al., 2005). Diese Daten werden durch eine weitere Studie aus den USA bestätigt, die bei 110 Fällen von Lymphomen aus den Jahren 1988 bis 1996 nur bei 25,5 % der Fälle eine Assoziation mit FeLV nachweisen konnte (Vail et al., 1998). Diese Studie verzeichnet auch eine Änderung in Signalement und der relativen Häufigkeit der anatomischen Lokalisationen im Vergleich zu älteren Studien. Während diese Studien Lymphome vor allem bei jungen (medianes Alter 4-6 Jahre), FeLV-positiven Katzen meist als Thymusform registrierten (Hardy et al., 1980; Jackson et al., 1996), konnte mit der Studie von Vail et al. (1998) eine Verlagerung des medianen Alters auf 9,5 Jahre sowie eine Zunahme der relativen Häufigkeit von intestinalen (34,7 %) und multizentrischen (18,8 %) Lymphomen dokumentiert werden.

Zurückgeführt wird dieses Phänomen von den Autoren auf die FeLV-Eradikationsprogramme zu Beginn der 80er Jahre.

Bei in Gießen und Leipzig untersuchten Leukosen der Katze aus dem Zeitraum von 1980 bis 1996 stand die multizentrische Leukose mit 40 % der Leukosen im Vordergrund. Die Thymusformen machten ca. 21 % der untersuchten Neoplasien dieses Komplexes aus. Die intestinale Leukose konnte bei circa. 15 % der Leukosen gefunden werden (Reinacher, 1997). Eine in Gießen durchgeführte Dissertation untersuchte 129 maligne Lymphome von Sektionskatzen aus Gießen und Leipzig. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von 1988 bis 1995 und 1998 bis 2000 (Gießen) sowie 1994 bis 1998 (Leipzig). Hierbei waren circa 46 % der Lymphome FeLV-positiv. Auch in dieser Arbeit standen die multizentrischen Lymphome mit 38 % im Vordergrund, wohingegen intestinale und mediastinale Lymphome jeweils ca. zu 25 % vertreten waren (Köhler, 2003).

2.3.1.2 Tumorpathogenese

Für die Eigenschaft dieses Virus, Tumoren auszulösen, spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. So können die so genannten LTRs (long terminal repeats) am 3'-Ende des

Virusgenoms als Promotoren für zelluläre Protoonkogene dienen und über die Aktivierung dieser Gene zum Tumorwachstum führen (Athas et al., 1995; Rohn und Overbaugh, 1995). Ein anderer Mechanismus ist die Insertionsmutagenese. Hierbei integriert sich das retrovirale Provirus in die Nähe von Genen, die für Zelldifferenzierung oder –wachstum zuständig sind (Varmus, 1988). Ein Beispiel dafür ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *c-myc* in feline T-Zell-Lymphomen (Athas et al., 1994; Neil et al., 1987; Varmus, 1988)

2.3.2 Das Feline Immundefizienz Virus (FIV)

Untersuchungen mit einer deutlichen Korrelation FIV-seropositiver Katzen mit dem Auftreten von Lymphomen geben Hinweise darauf, dass das Feline Immundefizienz-Virus (FIV) mit lymphatischen Neoplasien in Zusammenhang steht (Callanan et al., 1996; Callanan et al., 1992; Hutson et al., 1991; Schmidt et al., 1992). So wurden in Australien 50 % (Gabor et al., 2001b) bzw. 46 % (Court et al., 1997) der Katzen mit Lymphomen FIV-seropositiv getestet. Hier ist allerdings aus epidemiologischen Untersuchungen bekannt, dass die FIV-Prävalenz in der australischen Katzenpopulation deutlich höher liegt als bei Katzen in Mitteleuropa und den USA (Schmidt et al., 1992; Shaw et al., 1990).

Das zum Genus Lentivirus der Retroviridae zählende Feline Immundefizienz-Virus (Murphy et al., 1999) infiziert bevorzugt CD4-positive-Lymphozyten und führt so zu einer Immunsuppression sowie einer generalisierten Lymphadenopathie (Pedersen und Barlough, 1991).

Trotz der oben genannten Häufung des Auftretens von Lymphomen bei seropositiven Katzen konnte in den meisten Tumorzellen kein integriertes FIV-Genom nachgewiesen werden (Terry et al., 1995). Der Pathogenesemechanismus bei der Tumorgenese ist unklar. Vermutlich spielt die FIV-Infektion, vergleichbar der HIV-Infektion, eine indirekte Rolle (Beatty et al., 1998; Endo et al., 1997; Terry et al., 1995).

2.4 Limitierung der histologischen Diagnostik lymphatischer Proliferationen

Lymphoproliferative Erkrankungen stellen für die klinische wie auch die pathologische Untersuchung oft ein diagnostisches Dilemma dar. So kann klinisch eine generalisierte Lymphknotenvergrößerung bei der Katze sowohl auf eine neoplastische als auch eine reaktive bzw. entzündliche Ursache hindeuten (Sherding, 1994). Auch weiterführende diagnostische Maßnahmen wie die histologische Untersuchung von Biopsien lassen nicht immer eine

eindeutige Diagnose zu, da sich auch durch histopathologische und immunhistologische Verfahren lymphatische Neoplasien der Katze manchmal nicht eindeutig von reaktiven lymphatischen Infiltrationen oder reaktiven Proliferationen im lymphatischen Gewebe abgrenzen lassen. So beschreibt eine Studie von 1987 sechs Fälle von Katzen mit generalisierter Lymphadenopathie, welche histologisch Kriterien von Lymphomen wie Verlust der Lymphknotenarchitektur, hohe Mitoserate, Kapselinfiltration oder follikelartige Strukturen ohne Germinalzentren zeigten. Die Initialdiagnose des Lymphoms wurde jedoch aufgrund Rückbildung der Lymphknotenvergrößerung und fehlender klinischer Symptomatik 12 bis 84 Monate nach Diagnosestellung zugunsten einer nichtmalignen Lymphadenopathie geändert (Mooney et al., 1987).

2.5 Klonalitätsanalyse

Die Abgrenzung der neoplastischen von reaktiven Zellen kann durch den Nachweis von Eigenschaften gelingen, welche nur die Tumorzellen, nicht aber die ihnen morphologisch und immunhistologisch ähnlichen Zellen besitzen. Der entscheidende, für die Diagnostik nutzbare Unterschied ist in der somatischen Mutationstheorie der Karzinogenese formuliert. Diese Theorie postuliert, dass ein Tumor aus Zellen besteht, die alle Nachkommen einer Zelle sind, in welcher eine oder mehrere irreversible somatische Mutationen aufgetreten sind (Knudson, 1985). Tatsächlich ist es so, dass bei den meisten malignen Tumoren eine klonale Population von Zellen vorliegt (Levy et al., 1977). Eine klonale Population ist definiert als diejenigen Zellen, die aus der mitotischen Teilung einer einzelnen somatischen Zelle entstanden sind (Secker-Walker, 1985). Auch auf maligne lymphatische Neoplasien trifft diese Eigenschaft zu (Levy et al., 1977). Der Nachweis der Klonalität einer neoplastischen Population kann dann erfolgen, wenn es möglich ist, mit Hilfe eines Markers die Homogenität der neoplastischen Population im Gegensatz zu einer heterogenen, nicht neoplastischen Vergleichspopulation zu zeigen.

Die Methoden der Klonalitätsanalyse können weitestgehend in folgende Kategorien eingeteilt werden: Untersuchung der Inaktivierung von X-Chromosomen, Nachweis somatischer Mutationen, Analyse viraler Integrationen und Lymphozytenanalyse (Wainscoat und Fey, 1990).

2.5.1 Untersuchung der Inaktivierung von X-Chromosomen

Bei weiblichen Säugetieren wird eines der beiden X-Chromosomen jeder Zelle während der frühen Embryonalentwicklung inaktiviert und dies wird stabil auf die Nachkommen der Zelle vererbt (Brown und Chandra, 1973; Lyon, 1988). Welches der beiden X-Chromosome dabei

inaktiviert wird, ist zufällig (Brown und Chandra, 1973). Somit besteht in einer polyklonalen Population ein Mosaik aus Zellen, in denen entweder das mütterliche oder das väterliche X-Chromosom inaktiviert ist. Bei einer monoklonalen Population dagegen besteht ein einheitliches Muster inaktivierter mütterlicher oder väterlicher X-Chromosomen.

Ein Beispiel für den Einsatz dieser Untersuchungsmethode ist die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) Isoenzymanalyse.

Diesem Verfahren zugrunde liegt die Tatsache, dass das Enzym G6PDH auf dem X-Chromosom kodiert ist (Martini et al., 1986) und in mehreren Varianten vorkommen kann (Beutler et al., 1967). Weibliche Säugetiere, die heterozygot für diese verschiedenen Varianten sind, exprimieren in normalen Geweben demnach verschiedene Varianten des Enzyms, in jeder einzelnen Zelle jedoch nur eine Variante. Ein Tumor, bestehend aus einer monoklonalen Population, wird also ein einheitliches Muster von G6PDH-Varianten zeigen (Beutler et al., 1967).

Der Klonalitätsnachweis über die Untersuchung inaktivierter X-Chromosomen ist allerdings natürlicherweise auf Säugetiere mit zwei X-Chromosomen beschränkt.

2.5.2 Nachweis somatischer Mutationen

Bei vielen humanen Tumoren konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen einheitliche, nicht zufällige chromosomale Aberrationen aufweisen (Mitelman et al., 2006), die durch Chromosomenanalyse als Klonalitätsmarker dienen können.

Als weiterer Klonalitätsnachweis dient in der Humanmedizin die Analyse von Punktmutationen, bevorzugt in den Onkogenen verschiedener Tumoren. Ein wichtiges Beispiel hierfür sind Punktmutationen im *ras* Onkogen (Bos et al., 1984).

Als Möglichkeit der Detektion einer klonalen Tumorphopulation dient auch das „DNA Fingerprinting“. Diese Methode nutzt DNS-Sonden, die spezifisch an im Genom verteilte, sich nacheinander wiederholende Sequenzen, sog. VNTRs (Variable Numbers of Tandem Repeats) oder Mikrosatelliten, binden und so nach enzymatischer Verdauung des Genoms und elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente ein individuell spezifisches Bandenmuster ergeben (Jeffreys et al., 1985). Diese ursprünglich in der Forensik und zum Abstammungsnachweis genutzte Methode unterscheidet nicht nur unterschiedliche Individuen. Sie kann auch genetisch unterschiedliche Zellpopulationen innerhalb eines Individuums nachweisen, wie sie bei Tumoren mit somatischen Mutationen vorliegen (Fey et al., 1988).

2.5.3 Analyse viraler Integrationen

Die Integration von retroviralen Proviren ins Genom des Wirtsorganismus geschieht zufällig (Varmus, 1988). Entsteht aus einer retroviral infizierten Zelle, möglicherweise durch den Einfluss des integrierten Provirus, durch mitotische Teilung ein Tumor, so ist in allen Zellen dieses Tumors das Provirus an der gleichen Stelle integriert. Dies kann als Klonalitätsmarker dienen und wird in der Humanmedizin beispielsweise im Zuge der Diagnostik der adulten T-Zell-Leukämie eingesetzt (Takemoto et al., 1994).

Ein ähnliches Prinzip liegt der Klonalitätsdiagnostik von mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziierten Tumoren zugrunde. Die DNS des EBV ist vor der Infektion der Zelle ein doppelsträngiges lineares Molekül mit homologen, sich nacheinander wiederholenden Sequenzen (tandem repeats) an beiden Enden, wobei die Anzahl der tandem repeats zwischen den Einzelnviren variiert (Given et al., 1979).

Nach der Infektion der Zelle durch ein Virus werden die Enden fusioniert und die DNS des Virus liegt im latenten Zustand als zirkuläres episomales Molekül vor (Adams und Lindahl, 1975; Lindahl et al., 1976). Bei der Zellteilung im Zuge einer Tumorphiliferation wird die Virus-DNS ebenfalls amplifiziert und auf die Tochterzellen übertragen. Sie kann somit über die unterschiedliche Anzahl der tandem repeats und damit durch eine unterschiedliche Größe der Moleküle als Klonalitätsmarker dienen (Raab-Traub und Flynn, 1986; Shigehiko Ishihara, 1997; Walling et al., 2004).

2.5.4 Lymphozytenanalyse

Ziel der Klonalitätsdiagnostik bei lymphoproliferativen Erkrankungen sind die spezifischen Rezeptoren der Lymphozyten. Dies sind der T-Zell-Rezeptor im Falle der T-Lymphozyten und der B-Zell-Rezeptor im Falle der B-Lymphozyten.

2.5.4.1 Molekularbiologische Grundlagen

2.5.4.1.1 B-Zellen

Jede B-Zelle produziert ein individuelles Immunglobulinmolekül, das als Oberflächenmolekül in die Zytoplasmamembran eingebunden wird und somit Teil des B-Zell-Rezeptors wird (Wall und Kuehl, 1983). Der B-Zell-Rezeptor hat zwei verschiedene Funktionen. Einerseits bindet er effizient Antigene und diese können nach Endozytose und Prozessierung T-Helferzellen präsentiert werden (Chesnut und Grey, 1981). Andererseits überträgt der B-Zell-Rezeptor ein Signal, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des weiteren Verhaltens der Zelle spielt (Gold et al., 1990; Lane et al., 1990).

2.5.4.1.2 Aufbau des B-Zell-Rezeptors

Das Immunglobulinmolekül ist in der Zellmembran mit heterodimeren Proteinen assoziiert. Diese Heterodimere bestehen aus zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Proteinen, die als Ig- α und Ig- β bezeichnet werden (Reth, 1992).

Das Immunglobulinmolekül selbst besteht aus zwei identischen schweren (55 oder 70 kD) (Abbas et al., 2000a) und zwei identischen leichten Proteinketten (ca. 24 kD) (Abbas et al., 2000a). Dabei sind die leichten Ketten jeweils über eine Disulfidbrücke kovalent mit einer der schweren Ketten und die schweren Ketten untereinander ebenfalls über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Fleischman, 1966). In ihrer Gesamtheit bilden die Ketten zusammen eine Art Y-Struktur (Davies und Chacko, 1993).

Sowohl die leichten, als auch die schweren Ketten weisen so genannte Domänen auf. Dies sind Gruppen von sich wiederholenden homologen Abschnitten, die 70 bis 110 Aminosäuren lang sind und aus zwei β -Faltblättern bestehen (Edmundson et al., 1975). Diese β -Faltblätter bestehen aus jeweils drei bis fünf antiparallelen Ketten (Schiffer et al., 1973) und sind untereinander ebenfalls durch Disulfidbrücken verbunden (Edmundson et al., 1975).

Von diesen Domänen besitzen die leichten Ketten jeweils zwei, die schweren Ketten je nach Klasse vier bis fünf (Davies und Chacko, 1993).

Es gibt zwei verschiedene Klassen von leichten Ketten, κ und λ , wobei aufgrund der Identität der beiden leichten Ketten in einem Immunglobulinmolekül immer nur eine Klasse vorkommt und niemals beide nebeneinander. Das Verhältnis von Antikörpern mit κ -Leichtketten zu Antikörpern mit λ -Leichtketten ist speziesabhängig. Es beträgt im gesunden Organismus beispielsweise beim Menschen 0,8:1 bis 2,2:1 (Reichard et al., 2003) und bei der Katze 3:1 (Klotz et al., 1985).

Bei den schweren Ketten sind für den Menschen fünf Klassen beschrieben α , γ , δ , ϵ und μ (Davies und Chacko, 1993), welche die Zugehörigkeit eines Antikörpermoleküls zu den verschiedenen Immunglobulinklassen (IgA, IgG, IgD, IgE und IgM) determinieren (Lennox und Cohn, 1967). Bei der Katze wurden bislang IgG, IgA, IgM und IgE gefunden (Tizard, 2004).

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Antikörpermoleküle miteinander fällt auf, dass sich die Sequenzen im Bereich des Aminoendes der Proteine stark unterscheiden. Dies betrifft sowohl die ersten Domänen der leichten, als auch der schweren Ketten (Lennox und Cohn, 1967). Die Sequenzen der folgenden Domänen hingegen sind bei Molekülen einer Klasse annähernd gleich (Lennox und Cohn, 1967). Aufgrund dieser Unterschiede in der Aminosäurevariabilität werden die ersten Domänen als „variable“

Domänen und die folgenden als „konstante“ Domänen bezeichnet. Die variablen Domänen jeweils einer leichten und einer schweren Ketten bilden zusammen den Bereich, in dem Antigen gebunden werden kann. Dieser Bereich wird als „V-Region“ (variable region) des Moleküls bezeichnet. Die übrigen, konstanten Domänen bilden die so genannte „C-Region“ (constant region) (Williamson, 1976).

Der weitergehende Sequenzvergleich der Aminosäuren der V-Region zeigt, dass hier drei hypervariable Bereiche von vier Bereichen geringer Variabilität umrahmt werden (Kabat et al., 1979), wobei die hypervariablen Bereiche die Stellen mit Antigenkontakt bilden und daher als „complimentary-determining region“ (CDR1-3, „Gegenstück-bildende Regionen“) bezeichnet werden (Wu und Kabat, 1970). Die Bereiche mit geringer Variabilität in der Aminosäuresequenz werden als „framework region“ (FR1-4, „Gerüstregionen“) bezeichnet (Wu et al., 1979).

2.5.4.1.3 V(D)J-Rekombination

Die große Zahl der bei Säugetieren vorkommenden verschiedenen Antikörper bzw. Immunglobuline wird nicht durch viele einzelne Gene kodiert. Ihre Gene setzen sich vielmehr aus mehreren Teilen zusammen (Tonegawa, 1983). Bei den Genen der V-Region der schweren Kette sind dies drei Teile, die als *V* („variable“), *J* („joining“) und *D* („diversity“) (Berman et al., 1988; Bernard et al., 1978; Early et al., 1980) bezeichnet werden. Anzumerken ist hierzu, dass der Begriff der „V-Region“ somit sowohl für den variablen Anteil des Proteins, als auch für einen Teil der Gene verwendet wird, die dieses Protein kodieren. In den Genen der leichten Ketten gibt es nur *V* und *J* Bereiche (Berman et al., 1988). Die Gene liegen jeweils in multipler Ausführung vor. So existieren in der Keimbahn beim Menschen für die schwere Kette des Immunglobulins 100 – 200 *V*-Gene, 16 – 50 *D*-Gene und 6 *J*-Gene. Aufgrund von Übereinstimmungen in der Sequenz der *V*-Gene können diese zu 7 Gen-Familien zusammengefasst werden (Lefranc, 2001), wobei die einzelnen Mitglieder dieser Familien (je nach Autor auch als „Untergruppen“ bezeichnet) eine Übereinstimmung von mindestens 75 % auf Nukleotidebene haben (Giudicelli und Lefranc, 1999). Jedem *V*-Gen am 5'-Ende unmittelbar vorangellagert ist ein Genabschnitt, der ein so genanntes „leading“-Protein kodiert. Dieser Genabschnitt wird als „leader region“ bezeichnet (Tonegawa et al., 1978). Die Abstände zwischen den Genen der *V*-, *D*- und *J*- Region betragen in der Keimbahnkonfiguration mehrere Kilobasenpaare (Berman et al., 1988).

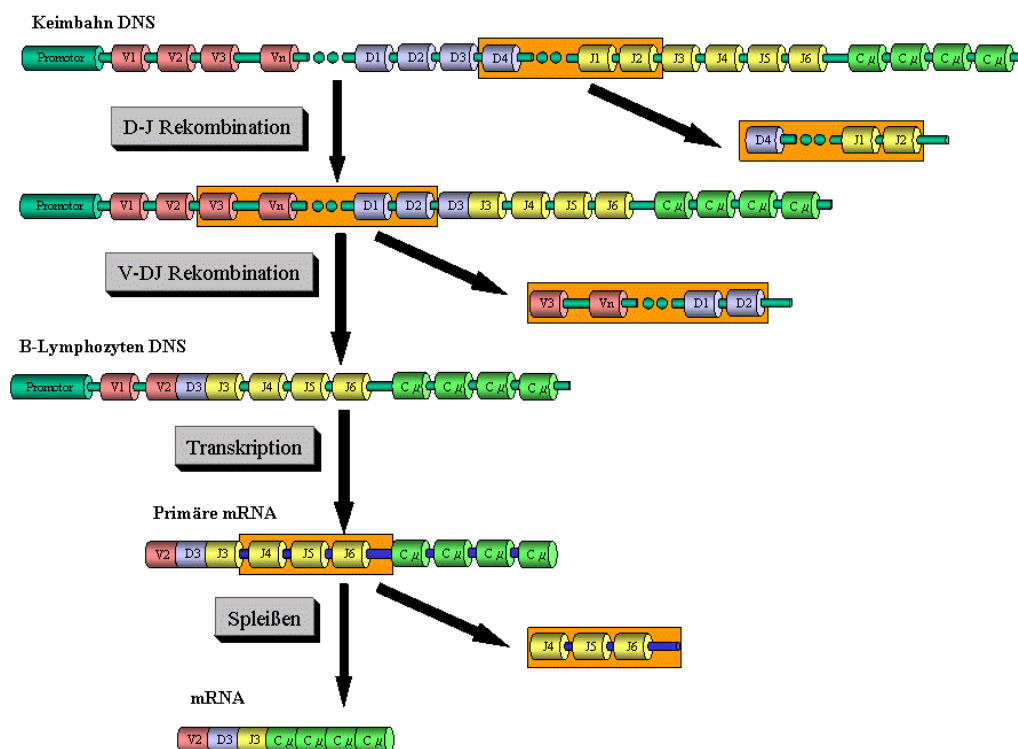
Um eine möglichst breite Diversität der Antikörper zu erreichen, wird aus den Gensegmenten der verschiedenen Elemente jeweils eines gewählt und mit den anderen zu einem funktionellen Gen kombiniert.

Dieses erstmals 1965 postulierte (Dreyer und Bennett, 1965) und 1978 auf DNS-Ebene nachgewiesene (Brack et al., 1978; Seidman et al., 1978) Rearrangement der Gene wird als **V(D)J-Rekombination** (vgl. Abbildung 1) bezeichnet.

Hierbei wird im Falle der schweren Kette zunächst eines der Gene für die D-Region mit einem Gen für die J-Region kombiniert (D-J Rekombination). Im nächsten Schritt wird ein V-Gen mit den bereits rekombinierten Teilen zusammengeführt (V-DJ Rekombination). In dieser Konfiguration liegt die DNS in reifen Lymphozyten vor. Bei den beschriebenen Schritten werden die zwischen den rearrangierten Segmenten liegenden, nicht benutzten Gensegmente enzymatisch eliminiert. Die in 5'-Richtung der DNS liegenden nicht verwendeten V-Gene müssen nicht durch einen enzymatischen Schritt eliminiert werden, da lediglich das rearrangierte V-Segment transkribiert wird (Janeway et al., 1999).

Die Zusammenführung des durch die Rekombination entstandenen Exons für den variablen Anteil der schweren Kette mit den Genen der konstanten Region und die Elimination der nichtrearrangierten J-Anteile wird erst durch das Spleißen im Zuge der RNS-Prozessierung erreicht (Rabbitts, 1978).

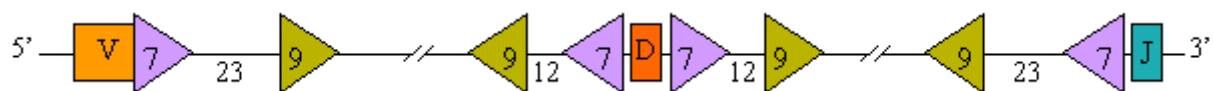
Abbildung 1: Schema der V(D)J-Rekombination



Die Rekombination beginnt damit, dass ein Enzymkomplex, in seiner Gesamtheit als **V(D)J-Rekombinase** bezeichnet (Abbas et al., 2000b), an spezifische Erkennungssequenzen der Lymphozyten-DNS bindet. Die dafür verantwortlichen Anteile des Komplexes sind zwei Proteine, die gemeinsam ausschließlich in reifenden Lymphozyten exprimiert werden und deren kodierende Gene aufgrund der Funktion ihrer Produkte als **recombination activating gene 1** (RAG1) (Schatz et al., 1989) und **recombination activating gene 2** (RAG2) (Oettinger et al., 1990) bezeichnet werden. Die RAG-Proteine binden an die so genannten **recombination signal sequences** (RSS). Diese Sequenzen bestehen aus einem hochkonservierten Bereich von sieben Nukleotiden (5'-CACAGTG-3' oder 5'-CACTGTG-3' mit geringen Variationen), dem sogenannten Heptamer und einem hochkonserviertem Bereich von neun Nukleotiden (5'-ACAAAAACC-3' oder 5'-GGTTTTTGT-3' mit geringen Variationen), welcher als Nonamer bezeichnet wird. Zwischen diesen beiden liegt ein wenig konservierter Bereich aus entweder 12 ± 1 oder 23 ± 1 Nukleotiden. Dies entspricht annähernd einer oder zwei Windungen der DNS in der Doppelhelix (McBlane et al., 1995). Je nach Größe des Abstandes werden die Erkennungssequenzen als 12-RSS oder 23-RSS bezeichnet (Max et al., 1979; Sakano et al., 1979).

Die RSS flankieren die kodierenden Bereiche der Gensegmente des variablen Teils der schweren Kette. 23-RSS finden sich jeweils in 3'-Richtung neben den Genen der V-Region und in 5'-Richtung neben den Genen der J-Region, wohingegen die Gene der D-Region beidseits von 12-RSS flankiert werden (vgl. Abbildung 2) (Max et al., 1979; Sakano et al., 1979).

Abbildung 2: Lage der RSS-Sequenzen in Verhältnis zu den codierenden Sequenzen (Abbas et al., 2000b)



Die Anordnung der RSS lässt den Schluss zu, dass eine effiziente Rekombination nur zwischen einem Gensegment mit einem 12-RSS und einem Gensegment mit einem 23-RSS stattfindet (Early et al., 1980). Diese Einschränkung wird als „12/23-Regel“ bezeichnet (Tonegawa, 1983). Der Regel folgend, kann im Falle der schweren Kette ein D-Segment mit einem J_H-Segment kombiniert werden und ein V-Segment mit einem D-Segment, wohingegen eine direkte Kombination eines V_H-Segmentes mit einem J-Segment im Regelfall nicht geschieht.

Nachdem die Rekombinase über die RAG-Proteine zunächst an eines der RSS (12 oder 23) gebunden hat, wird durch die Bindung des entsprechenden zweiten, zu einem anderen

Gensegment gehörenden RSS (23 oder 12) die sog. **Synapsis** bzw. der **synaptische Komplex** gebildet (Hiom und Gellert, 1998). In diesem Enzym-DNS-Komplex erzeugen die RAG-Proteine zwei Doppelstrangbrüche, wodurch die DNS genau zwischen den RSS und den codierenden Elementen gespalten wird (McBlane et al., 1995; van Gent et al., 1995). Darauf folgend werden die entstehenden Enden der DNS durch die RAG-Proteine unter Beteiligung von DNS-Reparaturenzymen so miteinander verbunden, dass zwischen den Immunglobulingenen eine so genannte kodierende Verbindung und zwischen den beiden Heptameren eine so genannte Signalverbindung entsteht (McBlane et al., 1995).

2.5.4.1.4 Mechanismen zur Erhöhung der Antikörperdiversität

2.5.4.1.4.1 Kombinatorische Diversität

Durch die Kombination der einzelnen Gensegmente der variablen Anteile wird eine sehr hohe Zahl von Proteinen für die Antikörperketten kodiert, wobei die genaue Zahl von der Menge der kombinierbaren funktionellen Gensegmente abhängig ist. Die Diversität wird zusätzlich dadurch erhöht, dass die rekombinierten schweren Ketten mit den ebenfalls rekombinierten leichten Ketten zu einem Antikörpermolekül zusammengesetzt werden. Die kombinatorische Diversität des Antikörpermoleküls ist dadurch zumindest theoretisch das Produkt aller möglichen Kombinationen der schweren mit allen möglichen Kombinationen der leichten Kette.

De facto ist der Grad der kombinatorischen Diversität jedoch geringer, da nicht alle Rekombinationen gleich häufig auftauchen und nicht alle Paarungen von leichter und schwerer Kette einen funktionellen Antikörper bilden (Abbas et al., 2000b).

2.5.4.1.4.2 Junktionale Diversität

Die dritte hypervariable Region der schweren Kette (CDR3) wird im Gegensatz zu den beiden ersten nicht ausschließlich vom V-Segment des variablen Anteils codiert. Dieser Bereich besteht vielmehr aus der D-Region und der Verbindungssequenz zwischen V-Region und D-Region auf der einen Seite sowie der Verbindung zwischen D-Region und J-Region auf der anderen Seite (Seide und Kehoe, 1983).

In dieser Region wird die Diversität durch Hinzufügen und Entfernen von Nukleotiden im Laufe der Rekombination erhöht. Diese hinzugefügten Nukleotide werden je nach Entstehungsart als P- oder N-Nukleotide bezeichnet.

P-Nukleotide sind **p**allindromische Sequenzen, die an das Ende der Gensegmente angefügt werden. Während nach der Erzeugung der Doppelstrangbrüche an den Heptameren glatte 5'-

phosphorylierte Enden entstehen (Roth et al., 1993; Schlissel et al., 1993), die zur Bildung der Signalverbindung präzise miteinander verbunden werden, bilden die Enden der kodierenden Segmente zunächst durch einen nukleophilen Angriff der 3'-gelegenen OH-Gruppe auf die gegenüberliegende Phosphodiesterbindung eine sog. Haarnadelformation aus, welche die freiliegenden Enden quasi versiegelt (Roth et al., 1992). Darauf folgend wird in der Nähe der Haarnadelformation an zufälliger Stelle ein Einzelstrangbruch erzeugt, so dass überhängende Einzelstränge entstehen, die aus einigen Nukleotiden der kodierenden Bereiche und ihren komplementären Nukleotiden bestehen (Besmer et al., 1998).

Zu diesem Zeitpunkt werden zufällig bis zu 20 sog. N-Nukleotide ohne Matritze (**non-template encoded**) von dem Enzym **Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT)** an das Ende der Einzelstränge eingefügt (Gilfillan et al., 1993; Komori et al., 1993).

In einem nächsten Schritt verbinden sich die beiden Einzelstränge über eine kurze Strecke miteinander, wobei durch Reparaturenzyme mit Exonukleaseaktivität ungepaarte Nukleotide entfernt werden. Die fehlenden komplementären Nukleotide der Einzelstränge werden darauf folgend ergänzt und somit die kodierende Verbindung vollendet (Grawunder und Harfst, 2001).

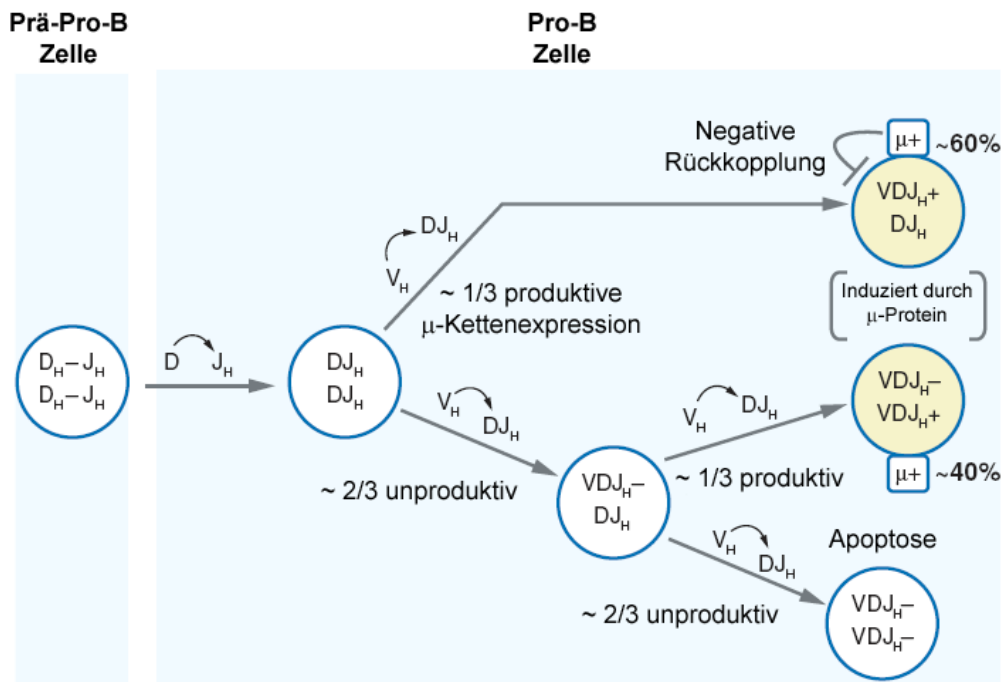
Aufgrund der Insertion der P- und N-Nukleotide wird die kodierende Verbindung auch als unpräzise Verbindung bezeichnet (Jung und Alt, 2004).

Durch die Zufälligkeit, in der die P- und N-Nukleotide addiert werden, entstehen nicht nur Produkte, die in der Basenzusammensetzung einzigartig sind. Die so entstandenen „neuen“ Gene unterscheiden sich auch jeweils in der Länge voneinander.

Misslingt die Rekombination in dem Sinne, dass kein funktionelles Gen entsteht, wird das zweite Allel umgelagert. Sollte auch das nicht zu einem funktionellen Ergebnis führen, erfolgt die Apoptose der Zelle (Waldmann, 1987). Der zugrundeliegende Mechanismus dieses als „allelischer Ausschluss“ bezeichneten Vorgangs ist noch nicht endgültig geklärt (Jung et al., 2006). Ergebnisse verschiedener Studien unterstützen jedoch die Theorie, dass im Pro-B-Zell Stadium zunächst auf beiden Allelen die D-J Rekombination stattfindet. Daran anschließend findet auf einem Allel die Zusammenführung mit einem V-Segment statt (Alt et al., 1984). Dieses neu entstandene Gen wird transkribiert und, sofern möglich, translatiert. Falls so ein intaktes funktionelles Protein entsteht („ μ -Protein“), wird dieses in die Membran eingelagert und bildet mit den bereits vorhandenen Ig- α und Ig- β eine Art provisorischen Rezeptor, der über eine angeschlossene Signalkaskade die Umlagerung des zweiten Allels verhindert (Brouns et al., 1993; Jumaa et al., 2005; Matsuo et al., 1993) (vgl. Abbildung 3).

Durch die Kombination von junktionaler und kombinatorischer Diversität können beim Menschen geschätzte 10^{11} mögliche Genvarianten geschaffen werden. Dabei ist allerdings nur ein Teil funktional und wird exprimiert (Abbas et al., 2000b).

Abbildung 3: Modell des allelischen Ausschlusses, modifiziert nach Jung et al., 2006



2.5.4.1.4.3 Somatische Hypermutation

Bei der somatischen Hypermutation treten zufällige Punktmutationen in den bereits rearrangierten Genen der schweren Kette auf. Dieses Phänomen findet bei der antigenvermittelten Hypermutation im Zuge des Antigenkontaktes statt. Es dient einer Art Feineinstellung der Antigenerkennung, indem die Bindungsfähigkeit der Antikörper stark erhöht wird (Maizels, 1995). Wenn durch die somatische Hypermutation und die dadurch entstehende leicht veränderte Aminosäuresequenz des Antikörpers dieser besser das Antigen bindet, wird die Expression des Bcl-2-Protein erhöht, welches die Zelle vor Apoptose – dem „programmierten Zelltod“ – schützt. Wird keine gute Antigenbindung erreicht, ist die Expression des Bcl-2-Proteins niedrig und in der Zelle wird über die Aktivierung des so genannten FAS-Rezeptors die Apoptose ausgelöst (Mastache et al., 2006). Die somatische Hypermutation findet in bevorzugten Bereichen statt; vor allem CDR-1, CDR-2 und die dritte Framework-Region sind betroffen (Shapiro et al., 1999).

2.5.5 Diagnostische Anwendung

2.5.5.1 Humanmedizin

2.5.5.1.1 Southern Blotting

Die erste diagnostische Anwendung zur Identifizierung klonaler Lymphozytenpopulationen bestand im Einsatz des sog. „Southern Blottings“ Mitte der 80er Jahre (Arnold et al., 1983; Flug et al., 1985). Bei diesem Verfahren wird zunächst DNS aus dem zu analysierenden Gewebe extrahiert. Darauf folgend wird die DNS durch verschieden Restriktionsenzyme verdaut, wodurch Fragmente verschiedener Länge entstehen. Die Trennung dieser DNS-Fragmente erfolgt mittels Gelelektrophorese. Nach Übertragung der getrennten Fragmente auf Nitrozellulose werden diese mit Hilfe spezifischer Gensonden sichtbar gemacht. Diese Sonden sind gegen bestimmte Sequenzen, beispielsweise die Sequenz der J-Region der schweren Kette, gerichtet. An die Sonden gekoppelt sind Systeme, mit denen die Fragmente sichtbar gemacht werden können. Dies kann beispielsweise eine Kopplung mit einem radioaktivem Isotop sein, dessen Strahlung auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann (Southern, 1975). Für ein sichtbares Signal muss eine gewisse Menge der Sonden an der gleichen Stelle akkumulieren, d.h. es muss eine bestimmte Anzahl Moleküle gleicher Größe mit der Zielsequenz an dieser Stelle vorhanden sein.

Im Falle einer polyklonalen Lymphozytenpopulation kann je nach untersuchtem Gewebe lediglich die Keimbahnkonfiguration sichtbar gemacht werden, die in allen kernhaltigen, also auch den nicht lymphoiden Zellen des Gewebes, vorhanden ist. Die Fragmente der Lymphozyten-DNS mit ihren rearrangierten, jeweils unterschiedlich großen Genen für den Antigenrezeptor werden durch die Gelelektrophorese relativ gleichmäßig über die entsprechenden Größenbereiche verteilt, so dass an keiner Stelle so viel der Sonde binden kann, dass eine sichtbare Bande entsteht (Rezuke et al., 1997).

Liegt allerdings eine klonale Population wie im Falle eines Lymphoms vor, haben diese Zellen als Nachkommen einer einzigen Ausgangszelle alle das gleiche genetische Material, also alle gleichgroße Antigenrezeptorgene. Ist der Anteil der Tumorzellen an der untersuchten Gesamtpopulation groß genug - ca. 1-5 % aller rekombinierten Antigenrezeptoren (Medeiros und Carr, 1999) - entsteht eine sichtbare Bande, da sich die bei der Gelelektrophorese aufgetrennten Fragmente in einem Größenbereich akkumulieren (Rezuke et al., 1997).

Der Einsatz dieser Methode ist limitiert durch den hohen Arbeits- und Kostenaufwand sowie die großen Mengen DNS von guter Qualität, die benötigt werden (Lorenzen et al., 1994; Rezuke et al., 1997).

2.5.5.1.2 PCR

Anfang der 90iger Jahre wurde die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) für die Klonalitätsanalyse von Lymphomen erfolgreich etabliert (Bourguin et al., 1990; Brisco et al., 1990; Goudie et al., 1990; Trainor et al., 1990; Wan et al., 1990).

Die PCR ist eine Methode zur Synthese und Amplifikation von spezifischen Sequenzen doppelsträngiger DNS in vitro (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985). Grundlage der Reaktion ist der Einsatz von sog. Primern, kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden, die komplementär zur gesuchten Ausgangssequenz sind.

Man unterscheidet bei den Primern einen Vorwärtsprimer (forward oder sense primer), der in seiner Orientierung mit der Orientierung der notierten Sequenz übereinstimmt und einen Rückwärtsprimer (reverse oder antisense primer), der komplementär zur notierten Sequenz ist. Die beiden Primer werden in der Regel so gewählt, dass sie jeweils die Enden der gesuchten Sequenz binden (Sambrook et al., 1989).

Die Primer bilden nach Bindung an die zu amplifizierende Sequenz einen Ansatzpunkt für die DNS-Polymerase, die über mehrere Zyklen von Denaturierung der DNS und erneutem Binden der Primer spezifisch die Sequenz zwischen den beiden Primern amplifiziert (Baumforth et al., 1999).

Beim Einsatz der PCR zur Diagnostik von klonalen Lymphozytenpopulationen macht man sich zunutze, dass die einzelnen Gensegmente des variablen Anteils der Rezeptoren vor dem Genrearrangement zu weit auseinander liegen, um mit einer herkömmlichen PCR amplifiziert zu werden (Berman et al., 1988; Goudie, 1989; Goudie et al., 1990). Der Vorgang des Rearrangements bringt die Segmente jedoch so nahe zusammen, dass eine Amplifikation möglich wird (Medeiros und Carr, 1999).

Zur Unterscheidung einer klonalen von einer polyklonalen Population werden der Bereich mit höchster Diversität, also der CDR3 mit den N- bzw. P-Nukleotiden amplifiziert (Diaz-Cano, 1996). Dazu müssen Primer verwendet werden, die außerhalb dieses Bereichs binden, also in der V- bzw. der J-Region der Antigenrezeptor-Gene. Werden die Gene einer polyklonalen Population amplifiziert, sind die Amplifikate, bedingt durch das zufällige Entfernen und Hinzufügen von Nukleotiden beim Rearrangement, unterschiedlich groß. Liegt jedoch eine klonale Population vor, dominiert ein rearrangiertes Gen einer bestimmten Länge im Ausgangsmaterial, was zu einer Anhäufung von Amplifikaten einer Länge führt (Rezuke et al., 1997).

Die Sichtbarmachung der Amplifikate geschieht nach gelelektrophoretischer Auftrennung und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht. Handelt es sich bei dem Material um

Proben aus einer klonalen Lymphozytenpopulation, können diskrete Banden beobachtet werden. Proben polyklonaler Populationen stellen sich dagegen als unscharfer „Schmier“ bzw. Leitemuster dar (Medeiros und Carr, 1999).

Die Vorteile der PCR liegen in den geringen Anforderungen an die Probenqualität und -menge sowie dem geringeren Arbeits- und Zeitaufwand. Nicht zuletzt ist diese Methode kostengünstiger. Im Gegensatz zum Southern Blotting, bei dem sich qualitativ entsprechende DNS nur aus frischem oder gefrorenem Material sicher extrahieren lässt, kann hier DNS eingesetzt werden, die aus Material stammt, das in Paraffin eingebettet war (Lorenzen et al., 1994; Segal et al., 1992).

2.5.5.1.2.1 B-Zell-Neoplasien

Verschiedene Arbeitsgruppen benutzten bei menschlichen B-Zell-Lymphomen Primer, die auf unterschiedliche Abschnitte der Gene der V-Region der schweren Kette der Immunglobuline zielten. Da jedes einzelne V- bzw. J-Segment im Rearrangement verwendet werden kann, aber es aufgrund der Diversität der Gene nicht praktikabel ist, spezifische Primer für jedes Segment zu benutzen, wurden die relativ konservierten Bereiche, die „framework regions“ (FR) als Bindungsstelle der Primer gewählt. Eingesetzt wurden Primer, die an FR1 (Aubin et al., 1995; Deane und Norton, 1991), FR2 (Ramasamy et al., 1992) oder FR3 (Brisco et al., 1990) binden, jeweils in Verbindung mit Primern, die gegen die J-Region der schweren Kette gerichtet (FR4) sind.

Da diese Framework-Regionen eine Homologie aufweisen, kann die Zahl an Primern begrenzt werden. Um für FR2 und FR3 einen hohen Prozentsatz der möglichen Rekombinationen nachzuweisen, genügte jeweils ein Primer für alle V-Familien (sog. „Consensus“-Primer). Für FR1 konnten sowohl consensus Primer (FR1c) (Aubin et al., 1995) als auch familienspezifische Primer (FR1f) (Deane und Norton, 1991) entwickelt werden. Die Anzahl der J-Regionen in der Keimbahnkonfiguration ist im Vergleich mit den V-Regionen relativ niedrig, so dass hier Consensus-Primer einfach zu finden waren.

Die Methodik wurde zunächst an frischem oder gefrorenem Material angewendet, konnte später jedoch erfolgreich auf formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Material übertragen werden (Wan et al., 1990). Dies war möglich, da je nach Methode Moleküle mit Längen zwischen 100 und 300 Basenpaaren erzeugt werden und DNS dieser Länge aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Material gewonnen werden kann.

Mit dieser Methode war es möglich, klonale Populationen aufzudecken, die nur 0,1 % der untersuchten Lymphozyten ausmachen (Rezuke et al., 1997).

2.5.5.2 Veterinärmedizin

Da bei allen Säugetieren die Gene für die Antigenrezeptoren ähnlich aufgebaut sind, ist eine Übertragung der in der Humanmedizin angewendeten Techniken auf die Diagnose der malignen Lymphome bei den Haussäugetieren möglich. So unterscheiden sich höhere Vertebraten z.B. in einigen Regionen der Frameworks 2 und 3 der V-Region der schweren Ketten der Immunglobulingene nur wenig (Rast und Litman, 1994).

2.5.5.2.1 Hund

Beim Hund wurde das Southern Blotting zur Charakterisierung und Diagnose von kaninen Lymphomen eingesetzt. Untersucht wurden dabei das Rearrangement der schweren Kette des Immunglobulins sowie das Rearrangement des T-Zell-Rezeptors β (Momoi et al., 1993).

Die PCR fand Anwendung mit gegen die Gene des T-Zell-Rezeptor γ (Vernau und Moore, 1999), des T-Zell Rezeptor β (Dreitz et al., 1999) sowie gegen die Gene von Immunglobulin (Burnett et al., 2003) gerichteten Primern.

2.5.5.2.2 Katze

Die Übereinstimmung der Antigenrezeptorgene der Katze mit denen des Menschen beträgt 60 – 80 % (Cho et al., 1998). Gene der konstanten Region der schweren Kette (IGHM und IGHG) konnten im Bereich B3q26 lokalisiert werden (Cho et al., 1997).

Klonalitätsanalysen bei B-Zell-Lymphomen der Katze wurden bei den Untersuchungen zur Pathogenese FeLV- und FIV-induzierter Tumoren angewendet. Anwendung fand das Southern Blotting bei der klonalen Rekombination der IgH-Kette (Beatty et al., 1998; Endo et al., 1997; Terry et al., 1995) und des TCR- β (Abbas et al., 2000b; Beatty et al., 1998; Callanan et al., 1996; Endo et al., 1997; Terry et al., 1995).

Die PCR wurde erstmals in einer 2005 veröffentlichten Studie zur molekularen Diagnostik von feline intestinalen T-Zell-Lymphomen eingesetzt (Moore et al., 2005). Mittels der so genannten 5'-RACE-Methode (rapid amplification of cDNA ends), einer Amplifikation unbekannter, in 5'-Ende der DNS gelegener Sequenzen, gelang es den Autoren 31 Klone mit Sequenzen der V-Region des feline T-Zell-Rezeptors zu erzeugen und zu sequenzieren. Mit auf Grundlage dieser Sequenzen erzeugten Primern gegen die V- und J-Region konnte in 22 von 28 intestinalen T-Zell-Lymphomen Klonalität nachgewiesen werden.

Ersten Einsatz zur Diagnose von B-Zell-Lymphomen fand die PCR in einer ebenfalls 2005 erschienenen Studie (Werner et al., 2005). Hier konnten die Autoren mit der so genannten SMART-RACE-Technik (vgl. 3.5.2.3) 24 Transkripte der V-Region sowie der J-Region der

schweren Kette des feline Immunglobulins entschlüsseln und aufgrund der Analyse und Identifikation der Framework-Regionen sowie der CDRs zwei Consensus-primer, passend für alle der 24 Transkripte entwickeln. Ein Primer wurde zur Bindung an die Framework-Region 2 entwickelt (5'-CCAGGCTCCAGGGAAGGG-3'), der zweite zur Bindung an die Framework-Region 3 (5'-TCCAGAGACAACGCCAAGAAC-3'). Als Antisense-Primer wurden Primer eingesetzt, welche im Bereich der J-Region binden. Zum Einsatz kamen hierbei zwei sequenzspezifische Primer (5'-ACACCGTCACCAGGGCTCC-3', 5'-TGAGGACACTGTGACTATGGTTCC-3') sowie ein so genannter degenerierter Primer (5'-GGACACCGTCACYAKGVYTCC-3').

Ein degenerierter Primer wird eingesetzt, um gleichzeitig mehrere Sequenzen zu erfassen, die sich nur in wenigen Basen unterscheiden. Der degenerierte Primer ist ein Gemisch aus Primern, die jeweils die entsprechende Basenzusammensetzung abdecken.

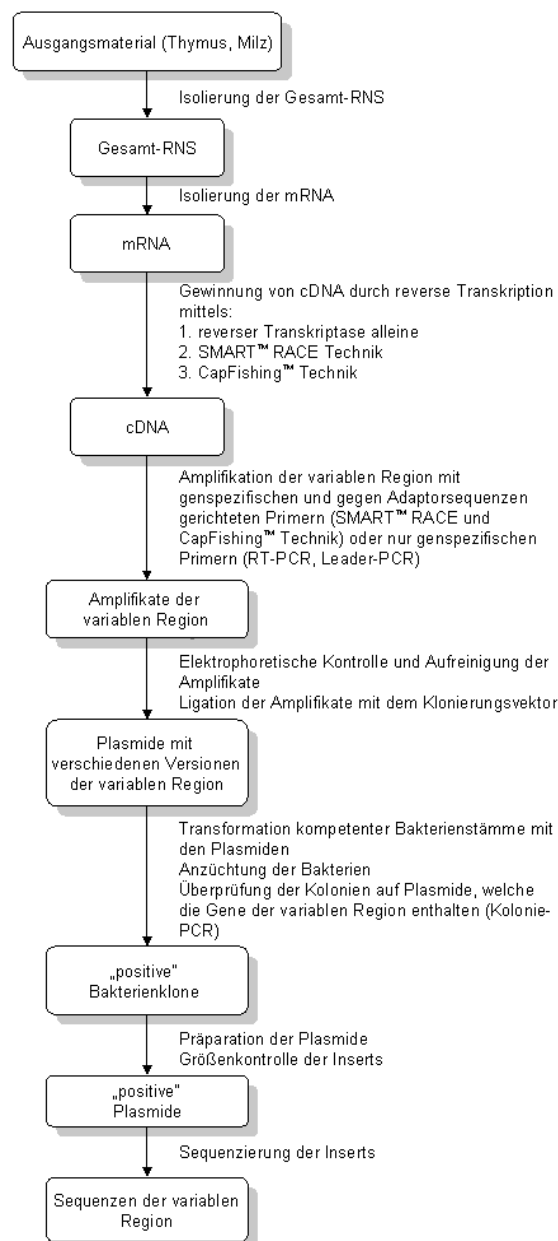
Mit diesem Primersystem wurden in der Studie 24 histologisch und immunhistologisch diagnostizierte B-Zell Neoplasien von Katzen untersucht. Zwei Proben wurden aufgrund schlechter DNS-Qualität aus der Studie ausgeschlossen. Bei 15 der übrig gebliebenen 22 Proben konnte eine monoklonale Population identifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Vorbemerkung

Für die Entwicklung der PCR-gestützten Klonalitätsdiagnostik war es zunächst notwendig, die Gensequenzen der variablen Region der schweren Kette des feline Immunglobulins zu analysieren und auf Grundlage dieser Analyse das zum Klonalitätsnachweis notwendige Primersystem zu entwickeln. Die Schritte vom biologischen Ausgangsmaterial bis zur Gewinnung der Sequenzen sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

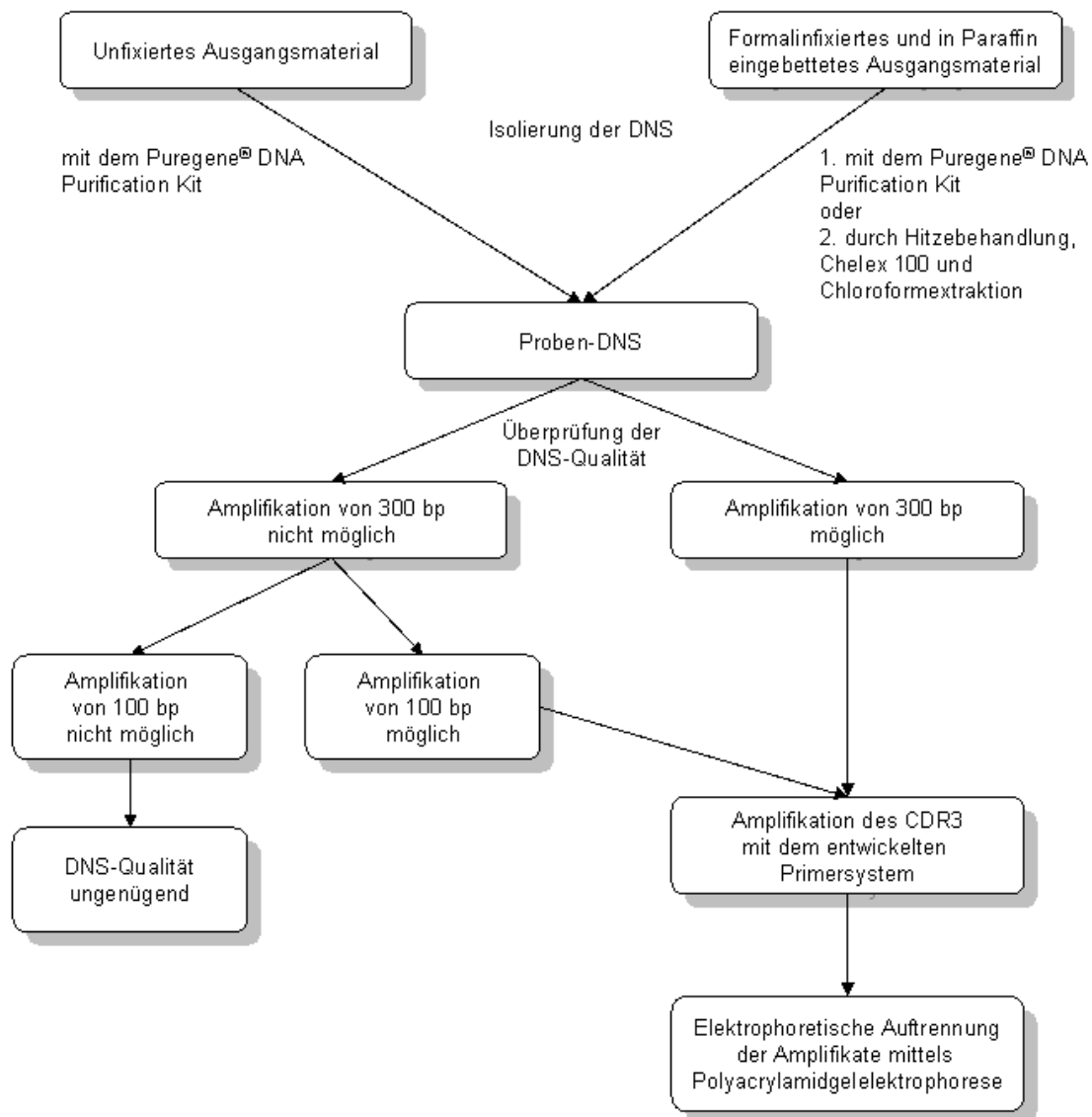
Abbildung 4: Schritte zur Analyse der Gene der variablen Region



Das auf Grundlage der Sequenzanalyse generierte Primersystem wurde an B-Zell-Lymphomen, T-Zell-Lymphomen und lymphatischen Hyperplasien getestet. Dazu wurde DNS von einer Vielzahl von Proben isoliert (s. Tabelle 59 und Tabelle 60) und jeweils zehn Proben aus jeder Kategorie (s. Tabelle 2 bis Tabelle 4) zum Test benutzt. Die Auswahl der Proben orientierte sich überwiegend an der Qualität, d.h. Amplifizierbarkeit, der DNS, wobei bewusst auch Proben weniger guter Qualität untersucht wurden (z.B. Fall 940/97).

Die Schritte vom biologischen Ausgangsmaterial bis zum Ergebnis der Elektrophorese sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

Abbildung 5: Schema des Tests des Primersystems



3.2 Biologisches Material

Für die Analyse der Gene des feline Immunglobulins, wurde als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von mRNA Gewebe (Milz, Thymus) verschiedener Katzen verwendet (vgl. Tabelle 1). Kriterium für die Verwendung des Gewebes von Sektionskatzen war der Frischzustand der Tiere. Die Tiere durften zum Zeitpunkt der Probenahme maximal 30 Minuten verstorben sein. Das Gewebe (ca. 1 x 1 x 0,5 cm große Proben) wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

Als Ausgangsmaterial zur Überprüfung des Diagnosesystems wurde entweder unfixiertes, oder formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe zur Gewinnung von DNS verwendet. Aufgrund deutlicher Unterschiede in der Qualität der isolierten DNS wurde eine Vielzahl von Proben isoliert, jedoch nur ein Teil der Proben für den Test des Diagnostiksystems eingesetzt (zur Art der Fixierung und die Isolierungsmethode aller Proben s. Tabelle 59).

Die genaue Herkunft der mit dem Diagnostiksystem untersuchten Proben ist in Tabelle 2 bis Tabelle 4 aufgeführt. Die Herkunft aller untersuchten Proben ist in Tabelle 60 aufgeführt.

Ein Teil der Tiere, deren Gewebe bzw. Blut entstammt dem Sektions- und Einsendungsgut des Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Bei den Geweben zur Überprüfung des Diagnosesystems wurden jedoch auch Proben von Einsendungen an das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig untersucht (Tagebuchnummern mit „L“ gekennzeichnet).

Tabelle 1: Geschlecht, Alter, Rasse der Katzen für die Analyse der feline Immunglobulingene

Tagebuchnr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Erkrankung
1234/02	EKH	18 Jahre	w	Teils solides, teils tubuläres Mammakarzinom
902/03	EKH	1 Jahr	m	Stumpfes Trauma
897/04	EKH	12 Wochen	m	Fraktur des dritten Brustwirbels
1675/04	EKH	7 Jahre	wk	Chromophobes Hypophysenadenom

EKH= Europäisch Kurzhaar; m= männlich; w= weiblich; wk= weiblich, kastriert; mk= männlich, kastriert

Tabelle 2: Geschlecht, Alter, Rasse der Katzen mit B-Zell-Lymphomen

Tagebuchnr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Klassifikation (WHO)	Lokalisation
3020/92 (L)	EKH	k.a.	w	Diffuse large B-cell lymphoma	Niere
T3597/06	EKH	16 Monate	k.a.	Diffuse large B-cell lymphoma	Niere
T383/05	k.a.	14 Jahre	wk	Diffuse large B-cell lymphoma	Niere
T1528/07	EKH	3 Jahre	m	Diffuse large B-cell lymphoma	Niere
2253/97 (L)	EKH	7 Jahre	wk	Diffuse large B-cell lymphoma	Darm
2047/95 (L)	EKH	k.a.	k.a.	Diffuse large B-cell lymphoma	Darm
T7795/05	EKH	10 Jahre	m	Diffuse large B-cell lymphoma	Auge
940/97 (L)	EKH	3 Jahre	mk	Diffuse large B-cell lymphoma	Darm
T7192/06	EKH	3 Jahre	mk	Follicular center cell lymphoma II	Lymphknoten
S1003/04	Siam	13 Jahre	m	Diffuse large B-cell lymphoma	Pankreas

EKH= Europäisch Kurzhaar m= männlich; w= weiblich; wk= weiblich, kastriert; mk= männlich, kastriert; k.a.= keine Angabe

Tabelle 3: Geschlecht, Alter, Rasse der Katzen mit lymphatischen Hyperplasien

Tagebuchnr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Lokalisation
T847/05	k.a.	14 Jahre	m	Pankreaslymphknoten
T878/05	ka	15 Jahre	w	Lymphknoten
T630/05	ka	2 Jahre	ka	Lymphknoten
T273/05	BKH	3 Jahre	mk	Mandibularlymphknoten
T3746/05	k.a.	1 Jahr	w	Mandibularlymphknoten
T6950/05	k.a.	2 Jahre	mk	Lymphknoten
T7426/06	k.a.	k.a.	wk	Flanke
S1592/04	EKH	8 Monate	m	Milz
S345/07	BKH	9 Jahre	m	Milz
S348/07	EKH	k.a.	m	Milz

EKH= Europäisch Kurzhaar, BKH= Britisch Kurzhaar;
m= männlich; w= weiblich; wk= weiblich, kastriert; mk= männlich, kastriert; k.a.= keine Angabe

Tabelle 4: Geschlecht, Alter, Rasse der Katzen mit T-Zell-Lymphomen

Tagebuchnr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Klassifikation (WHO)	Lokalisation
2155/90 (L)	EKH	12 Jahre	mk	Intestinal T-cell lymphoma	Darm
280/92 (L)	EKH	10 Jahre	wk	Intestinal T-cell lymphoma	Darm
93/93 (L)	EKH	13 Jahre	mk	Intestinal T-cell lymphoma	Darm
1989/98	EKH	7,5 Jahre	wk	Intestinal T-cell lymphoma	Darm
1379/99	EKH	15 Jahre	wk	Intestinal T-cell lymphoma	Darm
1945/90 (L)	Perser	5 Jahre	mk	T-cell lymphoblastic lymphoma	Niere
1883/94 (L)	EKH	Adult	m	Intestinal T-cell lymphoma	Darm
S1017/05	EKH	8 Jahre	mk	T-cell lymphoblastic lymphoma	Niere
217/94 (L)	EKH	9 Monate	w	T-cell lymphoblastic lymphoma	Thymus
15/96 (L)	EKH	8 Monate	m	Intestinal T-cell lymphoma	Darm

EKH= Europäisch Kurzhaar; m= männlich; w= weiblich; wk= weiblich, kastriert; mk= männlich, kastriert

3.2.1 Histologische und Immunhistologische Diagnose der verwendeten Proben

Die histologische und immunhistologische Diagnose und Klassifizierung der in dieser Arbeit verwendeten Lymphome und lymphatischen Hyperplasien wurde bei einem Teil der Proben durch die Routinediagnostik des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig Universität Giessen durchgeführt, der andere Teil wurde im Zuge einer aus dem selben Haus stammenden Dissertationsarbeit klassifiziert und diagnostiziert (Köhler, 2003). Grundlage der Klassifizierung der Routinediagnostik war die WHO-Klassifikation hämatopoetischer Tumoren der Haustiere (Valli et al., 2002). Der Arbeit von Köhler (2003) zugrunde lag die REAL-Klassifikation (Harris et al., 1994). Eine Korrektur der Diagnosen der benutzten Proben nach der neueren WHO-Klassifikation war nicht notwendig, da die Entitäten der Proben in beiden Klassifikationen identisch sind.

Der immunhistologische Nachweis von B-Lymphozyten erfolgte mit einem gegen CD45R gerichteten Antikörper (clone B220 [Ly 5], Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada), wohingegen T-Lymphozyten mit einem gegen CD3 gerichteten Antikörper nachgewiesen wurden (polyklonal, Dako, Hamburg). Die Markierung erfolgte nach Standardprotokollen (Kipar et al., 1998).

Die Klassifizierung als B- oder T-Zell-Lymphom erfolgte, wenn die überwiegende Zahl von Tumorzellen den entsprechenden Marker exprimierte. Gleichzeitig vorhandene kleinere Populationen von Lymphozyten, die den Marker der anderen Linie exprimierten, wurden als tumorinfiltrierende Lymphozyten interpretiert.

3.3 Isolierung von Nukleinsäuren

3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNS aus unfixiertem Gewebe mittels Purescript® RNA Purification Kit

Das Prinzip des Purescript® RNA Purification Kits (Gentra-Systems, Minnesota, USA) beruht auf Lyse der Zellen mittels anionischer Detergenzien gefolgt von einer modifizierten Salzpräzipitation der DNS und der Proteine in Kombination mit Inhibitoren der RNase Aktivität. Die gewonnene RNS wurde in Alkohol gefällt, gewaschen und in steriler Lösung rehydriert.

1. Vorbereitung des Gewebes:

Das Gewebe wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 25 mg in einem Kryotom (Frigocut 2700, Reichert-Jung GmbH, Nußloch) mit ca. 10 µm geschnitten.

2. Zelllyse:

Das gefrorene Gewebe wird in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, das mit 750 µl „Cell Lysis Solution“ gefüllt ist und zügig durch 5 bis 10 Stöße mit einem Minimörser homogenisiert.

3. Protein-DNS-Fällung:

Zu dem Zelllysats werden 250 µl „Protein-DNA Precipitation Solution“ hinzu gegeben, das Eppendorfgefäß 10-mal sanft geschwenkt und fünf Minuten in Eis inkubiert. Danach wird die Probe bei 16.000 x g für drei Minuten zentrifugiert, so dass DNS und Proteine ein dichtes Pellet formen.

4. RNS-Fällung:

Der RNS-haltige Überstand wird in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, das mit 750 µl 100%igem Isopropanol (2-Propanol) gefüllt ist und durch 50-maliges sanftes Schwenken vermischt. Darauf folgend wird die Probe bei 16.000 x g für drei Minuten zentrifugiert. Die RNS formt dabei ein kleines durchsichtiges Pellet. Der Überstand wird vorsichtig weggeschüttet.

5. Waschen der RNS:

Zu dem Pellet werden 750 µl 70%iges Äthanol gegeben und das Gefäß einige Male geschwenkt. Darauf folgend wird die Probe bei 16.000 x g für eine Minute zentrifugiert, das Äthanol vorsichtig abgesaugt und das Pellet bei offenem Deckel 15 Minuten luftgetrocknet.

6. RNS-Rehydrierung:

Zu dem Pellet werden 125 µl „RNA Hydration Solution“ gegeben, danach 30 Minuten auf Eis inkubiert, gründlich vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNS mittels Oligotex[®] mRNA Kit

Das Oligotex mRNA Kit zur Isolierung von poly A⁺ RNS aus Gesamt-RNS (Qiagen, Hilden) bedient sich eines patentierten Affinitätsmaterials (Oligotex Suspension) für die Detektion, Isolierung, Reinigung und enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren, die polyadenylierte Sequenzen enthalten. Das Material besteht aus sphärischen Polystyren-Latex-Partikeln, an die kovalent dC₁₀T₃₀-Oligonukleotide gebunden sind. An diese Oligonukleotide kann die mRNA, die im Gegensatz zu restliche RNS-Arten ein polyadenyliertes Ende besitzt, hybridisieren und so abgetrennt werden. Durch Verringerung der Ionenkonzentration kann diese Hybridisierung nach Isolierung des Oligotex-mRNA-Komplexes destabilisiert werden und die Oligotex-Partikel herausgefiltert werden.

1. Mischung der Komponenten:

Die Gesamt-RNS wird in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit RNase-freiem Wasser auf 250 µl aufgefüllt. Dazu werden 250 µl auf 70°C vorgewärmter „OEB“-Puffer und 15 µl der zuvor auf 37°C erwärmten, gevortexten und wieder auf Raumtemperatur abgekühlten Oligotex Suspension gegeben und gründlich vermischt.

2. Auflösung der Sekundärstruktur der RNS:

Die Mischung wird drei Minuten bei 70°C inkubiert.

3. Bindung an die Oligotex-Partikel:

Die Probe wird bei 20 bis 30°C zehn Minuten inkubiert.

4. Pelletierung des Oligotex-mRNA-Komplexes:

Die Probe wird zwei Minuten bei 18.000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig weggeschüttet.

5. Resuspendierung des Pellets und Filterung:

Das Pellet wird in 400 µl „OW2“-Puffer resuspendiert, in eine in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß platzierte Spin Column (Filtersäulchen für Zentrifugen) überführt und bei 18.000 x g eine Minute zentrifugiert.

6. Waschen des Oligotex-mRNA-Komplexes:

Das Säulchen wird in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 400 µl „OW2“-Puffer überschichtet und bei 18.000 x g eine Minute zentrifugiert.

7. Herauslösen der mRNA aus dem Oligotex-mRNA-Komplex:

Das Säulchen wird wiederum in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 20 bis 100 µl heißem (70°C) „OEB“-Puffer überschichtet, durch auf- und abpipettieren resuspendiert und bei 18.000 x g eine Minute zentrifugiert. Zur Erhöhung der Ausbeute sollte dieser Schritt einmal wiederholt werden.

8. Bis zur weiteren Verwendung wird die mRNA bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.3 Isolierung von DNS mittels Puregene® DNA Purification Kit

Das Prinzip des Puregene® DNA Purification Kits (Gentra-Systems, Minnesota, USA) beruht auf Lyse der Zellen mittels anionischer Detergenzien gefolgt von einer modifizierten Salzpräzipitation der DNS. Die gewonnene DNS wird in Alkohol gefällt, gewaschen und in steriler Lösung rehydriert.

3.3.3.1 Isolierung von DNS aus unfixiertem Gewebe

1. Vorbereitung des Gewebes:

Das Gewebe wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 75 mg in einem Kryotom (Frigocut 2700, Reichert-Jung GmbH, Nußloch) mit ca. 10 µm geschnitten. Um Kontamination mit Fremd-DNS zu minimieren, werden sowohl das Kryotommesser, als auch die verwendeten Geräte (Pinzette, Eppendorfgefäße) durch vorheriges Autoklavieren (121 °C, 20 Minuten) von DNS befreit und die Fläche der Schnittstreckerplatte mit steriler Operationsfolie abgedeckt.

2. Zelllyse:

Zu dem gefrorenen Gewebe werden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß 500 µl „Cell Lysis Solution“ gegeben und das Gewebe durch 5 bis 10 Stöße mit einem Minimörser weiter zerkleinert. Das Gewebe wird durch leichtes Auf- und Abpipettieren mit der „Cell Lysis Solution“ vermischt und die Flüssigkeit in ein 14 ml Falcon-Tube überführt. Das verbleibende Gewebe wird wiederum mit 500 µl „Cell Lysis Solution“ versetzt, zerkleinert, vermischt und in das Falcon-Tube überführt. Dies wird solange wiederholt, bis insgesamt 3 ml „Cell Lysis Solution“ zu dem Gewebe zugegeben wurden und das gesamte Gewebe aus dem 1,5 ml Eppendorfgefäß in das 14 ml Falcontube überführt wurde.

3. Proteinase K Behandlung:

Zu dem Gewebe werden 15 µl „Proteinase K Solution“ gegeben und die Probe bei 55°C über Nacht inkubiert.

4. RNase Behandlung:

Zu dem Zelllysats werden 15 µl „RNase A Solution“ gegeben, die Probe durch 25maliges Umdrehen vermischt und 15 bis 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

5. Proteinfällung:

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Probe mit 1 ml „Protein Precipitation Solution“ versetzt, 20 Sekunden kräftig gevortext und bei 2.000 x g zehn Minuten zentrifugiert.

Für größere Reinheit wird der Überstand in ein neues 14 ml Falcon-Tube überführt, die Probe erneut für 20 Sekunden gevortext und dann fünf Minuten in Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wird die Probe wiederum bei 2000 x g zehn Minuten zentrifugiert.

6. Fällung der DNS:

Der Überstand wird in ein mit 3 ml 100%igem Isopropanol (2-Propanol) gefülltes 14 ml Falcon-Tube überführt, 50 mal sanft umgedreht und bei 2.000 x g zehn Minuten zentrifugiert. Die DNS formt ein durchsichtiges kleines Pellet. Der Überstand wird vorsichtig weggeschüttet.

7. Waschen der DNS:

Zu dem Pellet werden 3 ml 70%iges Äthanol gegeben und das Gefäß einige Male umgedreht. Darauf folgend wird die Probe bei 2.000 x g eine Minute zentrifugiert, das Äthanol vorsichtig abgesaugt und das Pellet bei offenem Deckel 15 Minuten luftgetrocknet.

8. DNS-Rehydrierung:

Das Pellet wird mit 150 µl „DNA Rehydration Solution“ überschichtet, fünf Sekunden kräftig gevortext und über Nacht bei Raumtemperatur rehydriert.

Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3.3.4 Isolierung von DNS aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

3.3.4.1 Isolierung mit dem Puregene® DNA Purification Kit

1. Vorbereitung des Gewebes:

Von dem Paraffinblockchen mit der zu untersuchenden Probe werden das um die Probe liegende Paraffin und die nicht untersuchten Organe auf eine Tiefe von ca. 100 µm mit einer sterilen Mikrotomklinge per Hand entfernt, so dass das Gewebe möglichst ausschließlich das zu untersuchende Organ enthält.

20 mg des eingebetteten Gewebes werden mit einem Mikrotom (Microm HM 335 E, MICROM GmbH, Walldorf) mit ca. 10 µm geschnitten. Um Kontamination mit Fremd-DNS zu minimieren, werden sowohl die Klinge als auch die verwendeten Geräte (Pinzette, Eppendorfgefäße) durch vorheriges Autoklavieren bei 121 °C und 20 Minuten (Eppendorfgefäße) bzw. Trockensterilisieren bei 220 °C für 4 Stunden (Klinge, Pinzette) von DNS befreit und der Messerhalter mit steriler Operationsfolie abgedeckt. Weiterhin wird unmittelbar an den Messerhalter anliegend eine sterilisierte Auffangvorrichtung aus Aluminium angebracht.

2. Entparaffinierung:

Zu dem zerkleinerten Gewebe werden in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß 600 µl Xylol gegeben und unter konstanter Vermischung fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgend wird die Probe bei 16.000 x g ein bis drei Minuten zentrifugiert und der Überstand über dem pelletierten Gewebe verworfen.

Die Zugabe von Xylol, Inkubation und Zentrifugation werden zweimal wiederholt, so dass das Gewebe insgesamt dreimal mit Xylol gewaschen wird.

Danach werden 600 µl 100%iges Äthanol zu dem Gewebe gegeben und unter konstanter Vermischung fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wird wiederum bei 16.000 x g ein bis drei Minuten zentrifugiert und der Überstand über dem pelletierten Gewebe verworfen. Die Zugabe von Äthanol, Inkubation und Zentrifugation wird einmal wiederholt, so dass das Gewebe insgesamt zweimal mit Äthanol gewaschen wurde.

3. Zelllyse:

Das zerkleinerte, entparaffinierte Gewebe wird mit 600 µl „Cell Lysis Solution“ versetzt und zügig durch 5 bis 10 Stöße mit einem Minimörser homogenisiert.

4. Proteinase K Behandlung:

Zu dem Gewebe werden 3 µl „Proteinase K Solution“ gegeben und die Probe bei 55°C über Nacht inkubiert.

5. RNase Behandlung:

Zu dem Zelllysats werden 3 µl „RNase A Solution“ gegeben, die Probe durch 25maliges Umdrehen vermischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

6. Proteinfällung:

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Probe mit 200 µl „Protein Precipitation Solution“ versetzt, 20 Sekunden kräftig gevortext und bei 16.000 x g drei Minuten zentrifugiert.

Für größere Reinheit wird der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, die Probe erneut für 20 Sekunden gevortext und dann fünf Minuten in Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wird die Probe wiederum bei 16.000 x g drei Minuten zentrifugiert.

7. Fällung der DNS:

Der Überstand wird in ein mit 600 µl 100%igem Isopropanol (2-Propanol) gefülltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, 50 mal sanft umgedreht und bei 16.000 x g drei Minuten zentrifugiert. Die DNS formt ein durchsichtiges kleines Pellet. Der Überstand wird vorsichtig weggeschüttet.

8. Waschen der DNS:

Zu dem Pellet werden 600 µl 70%iges Äthanol gegeben und das Gefäß einige Male umgedreht. Darauf folgend wird die Probe bei 16.000 x g eine Minute zentrifugiert, das Äthanol vorsichtig abgesaugt und das Pellet bei offenem Deckel 15 Minuten luftgetrocknet.

9. DNS-Rehydrierung:

Das Pellet wird mit 150 µl „DNA Rehydration Solution“ überschichtet, fünf Sekunden kräftig gevortext und über Nacht bei Raumtemperatur rehydriert.

Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3.3.4.2 Isolierung durch Hitzebehandlung, Chelex 100 und Chloroformextraktion

Grundlage dieser Form der Extraktion ist eine Kombination zweier Protokolle aus zwei Studien zur effizienteren Extraktion von DNS aus formalinfixierten und paraffineingebetteten Geweben (Coombs et al., 1999; Shi et al., 2004).

1. Vorbereitung der Proben

Fünf Scheiben aus einem Paraffinblock, jede ca. 10 µm dick, werden wie unter (3.3.4.1) beschrieben gewonnen und in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

2. Entparaffinieren und Lösen der Quervernetzungen

Zu dem Paraffinmaterial werden 2,5 µl Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) und 497,5 µl 0,1 molare Natronlauge gegeben (0,5%ige Tween[®] 20 Lösung in 0,1 molarer NaOH) und das Gefäß 20 Minuten bei 100°C inkubiert.

Nach Abkühlen auf 55°C werden 2 µl Proteinase K zugegeben und das Gefäß drei Stunden bei 55°C inkubiert.

3. Binden der DNS

Zu der Probe werden 500 µl einer 5%igen Chelex 100-Suspension (in 1x Tris-Puffer) (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gegeben und das Gefäß zehn Minuten bei 99°C inkubiert. Nach sanftem Schwenken wird das 1,5 ml Eppendorfgefäß 15 Minuten bei 10.500 x g zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wird das Gefäß auf Eis inkubiert, bis das an der Oberfläche abgesetzte Paraffinwachs hart ist. Das Wachs wird vorsichtig entfernt.

4. Waschen der DNS

Die Probe wird auf 45°C erwärmt und 100 µl Chloroform dazugegeben. Nach sanftem Schwenken wird das Gefäß erneut für 15 Minuten bei 10.500 x g zentrifugiert. Die obere Phase wird abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Das Waschen der DNS wird zweimal wiederholt.

3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Mittels photometrischer Messung wurde die Extinktion der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ausgehend von einer Küvettendicke von 1 cm entspricht die Extinktion von 1 annähernd einer Konzentration von 50 µg DNS bzw. 40 µg RNS in 1 ml Volumen. Das gleichzeitig bestimmte Verhältnis aus der Extinktion bei 260 nm zu der Extinktion bei 280 nm gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäure und soll bei ca. 1,8 für DNS und 2,0 für RNS liegen.

3.4.2 Elektrophoretische Integritäts- und Konzentrationsbestimmung

Das unterschiedliche Wanderungsverhalten von Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe im elektrischen Feld erlaubt eine Aussage über die Integrität sowie die Menge im Vergleich mit einer DNS bekannter Größe und Konzentration (Basenleitern). Die Nukleinsäuren-Visualisierung erfolgte mit Ethidiumbromid unter UV-Licht (254-320 nm), wobei die Fluoreszenz der DNS-Menge proportional ist (Sambrook et al., 1989).

3.5 Amplifikation von Nukleinsäuren

3.5.1 Verwendete Oligonukleotide

Die Auswahl der verwendeten Oligonukleotide richtete sich, soweit möglich, nach den von Rychlik et al. (1995) publizierten Kriterien:

- Durchschnittliche Länge von 16-24 Basenpaaren.
- Möglichst einheitliche mittlere Schmelztemperatur in einem Primersystem, berechnet nach der Faustformel: $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.
- GC-Anteil: 50-60 %.
- Maximal 3 gleiche Basen hintereinander.
- Keine Haarnadelstrukturen von mehr als vier Basen.
- Keine Anlagerung der beiden im Paar verwendeten Primer von mehr als vier nebeneinander liegenden Basen.
- Keine Anlagerung der beiden Primer im Bereich der letzten 4 Basen am 3' Ende.

Die Primersynthese wurde von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, durchgeführt.

Ausgehend von der veröffentlichten Sequenz der C-Region der schweren Kette des felines IgM (Cho et al., 1998) wurden Primer zur Überprüfung der Sequenz am vorhandenen biologischen Material ausgesucht (vgl. Tabelle 5). Ausgangsmaterial für die weiteren Primersynthesen waren die oben genannte Sequenz und weitere selbst ermittelte Sequenzen.

Für die Wahl der Primer zur Bindung in der Leader-Region wurden zunächst alle funktionellen, d.h. nicht als Pseudogen identifizierten Sequenzen der Einzelgene der humanen V-Region (GenBank accession number: NG_001019) jeweils als Suchsequenz für das NCBI Trace Archiv (NCBI, Bethesda) eingesetzt und somit den einzelnen humanen Genen ähnliche Traces ermittelt.

In den dadurch gefundenen Sequenzen wurde für jede Familie in jeweils einem Trace das Startkodon ermittelt und, falls vorhanden, der folgende Bereich mit der humanen Leadersequenz verglichen. Der Leadersequenz-entsprechende Bereich wurde als Suchsequenz für eine weitere Recherche im Trace Archiv verwendet. Primer für die entsprechenden Bereiche wurden nach Vergleich der einzelnen positiven Traces nach möglichst großer Übereinstimmung mit den Sequenzen einer Familie entwickelt.

Tabelle 5: Sequenz und Orientierung der Primer zur Überprüfung der veröffentlichten Sequenz (Cho et al., 1998) der feline C-Region.

Primer	Basensequenz (5'-3')	Orientierung	Anlagerungstemp.	Amplikonlänge
FeIgMfI	CGTCACCTTCTCCTGGAA	Sense	58°C	1341 bp
FeIgMr2	ACATCTCACCCCATGAC	Antisense	58°C	

Tabelle 6: Sequenz und Orientierung der Primer zur Identifikation der feline V-, D- und J-Region

Primer	Basensequenz (5'-3')	Orientierung	Funktion
FeIgMfI	CTGTCCGACGAGCCCCTGGT	Sense	Primertest
FeIgMfII	CCTCATCCCGTCCAAATCTCTTCC	Sense	Primertest
FeIgMrI	GACTGGAGGGAAGGTCTGGATGTC	Antisense	Colony-screening Erste Amplifikation
FeIgMrII	CGTACTTGCCCTCTCTCAGGACTG	Antisense	Zweite Amplifikation cDNA-Synthese
FeIgMrIII	AGGGCAGGAGCACCTGAGAGGTAG	Antisense	Erste Amplifikation
FeIgMrIV	TCGATGTGAGGAAGTCATCTGAAC	Antisense	cDNA-Synthese
FeIgMrV	GGTTGTTGACCACACTGTTGTTCTTG	Antisense	Zweite Amplifikation
FeIgMrVI	GACAGGGAGCTCTCACAGGTGATG	Antisense	Colony-screening
IgHV3L	ATGGAGTTTGTGCTGGGCTGG	Sense	Bindung in Leader-Region
IgHV1L	CAATGGACTGGAGCTGGAGAATC	Sense	Bindung in Leader-Region
HuIgV2L	ATGGACATACTTTGTTCCAGGCTC	Sense	Bindung in Leader-Region
HuIgV4L	ACATGAAACAYCTGTGGTTCTTCC	Sense	Bindung in Leader-Region
HuIgV5L	ATGGGGTCAACCGCCATCCTCG	Sense	Bindung in Leader-Region
HuIgV6L	ATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTC	Sense	Bindung in Leader-Region
SMART II™	AAGCAGTGGTATCAACGCAGGTACGC GGG	Sense	First strand adapter
UPL	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT	Sense	5'-Adapterprimer
UPS	CTAATACGACTCACTATAGGG	Sense	5'-Adapterprimer
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Sense	5'-Adapterprimer

Tabelle 7: Sequenz und Orientierung der Diagnostik-Primer

Primer	Basensequenz (5'-3')	Orientierung	Position
V1FRI	GCAAAGCATCTGGATACAGCTTC	Sense	Familie VH1 Framework 1
V1FRIII	GAAGTTCCAGGGCAGACTCAC	Sense	Familie VH1 Framework 3
V3FRI	GTGGCCTCTGGATTACCTTC	Sense	Familie VH3 Framework 1
V3FRIII	CCGTGAAGGGCCGATTAC	Sense	Familie VH3 Framework 3
Jfam1	CACCGTCACCAGGGCTCCTTG	Antisense	J-Region
Jfam2	CACGGTGACCAGGGTCCCGGG	Antisense	J-Region
Jdeg	SACGGTGACYWGGGTDCCHTG*	Antisense	J-Region

* S = C oder G; Y = C oder T; W = A oder T; D = nicht C; H = nicht G

3.5.2 PCR-Verfahren

3.5.2.1 Primertest

Die optimale Anlagerungstemperatur der Primer wurde durch die Gradienten-Option des Multicyclers PTC 200 (Biozym, Oldendorf) ermittelt.

Als Polymerase kam eine *Taq*-Polymerase, die BioTherm™ DNA-Polymerase (NatuTec, Frankfurt) zum Einsatz. Die Zusammensetzung des PCR-Mastermix für diese Polymerase ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Mastermix für die BioTherm™ DNA-Polymerase

Reagenz	Bemerkung	Pro Ansatz (µl)
DEPC-Wasser		17,8
„10 x Reaction Buffer“**	10 fach konzentriert	2,5
MgCl ₂	25 mM	0,5
dNTPs	jeweils 10 mM	1
Sense-Primer	10 µM	0,5
Antisense-Primer	10 µM	0,5
BioTherm™ DNA-Polymerase	5 U/µl	0,2
DNS		2
Gesamtvolumen		25

* vom Anbieter der BioTherm™ DNA-Polymerase mitgelieferter Reaktionspuffer

Die Reaktionsbedingungen für die PCR sind in Tabelle 9 angegeben:

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen für die PCR mit der BioTherm™ DNA-Polymerase

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
Denaturierung	2 min 50 s	94°C	-
Schmelzen	15 s	92°C	35
Anlagern	30 s	Gradient	
Verlängern	15 s	72°C	
Abschließende Verlängerung	5 min	72°C	-
Kühlen	Bis Entnahme	4°C	-

Die Gradienten Option ermöglicht es, in einem Experiment 12 unterschiedliche Anlagerungstemperaturen innerhalb eines Temperaturintervalls von maximal 20 °C gleichzeitig zu testen. Das Temperaturintervall für die einzelnen Primerpaare orientierte sich dabei an der errechneten Schmelztemperatur.

Die Temperaturbedingungen für die Gradienten-PCR sind in Tabelle 10 exemplarisch für das Primerpaar FeIgMf1/FeIgMr2 aufgeführt.

Tabelle 10: Exemplarische Temperaturverteilung für die Gradienten-PCR

Temperaturintervall in °C	Position auf dem Heizblock											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
54 – 62	54,0	54,2	54,7	55,3	56,3	57,5	58,8	60,0	60,8	61,4	61,9	62

3.5.2.1.1 Ergebniskontrolle

Die Kontrolle der Amplifikation erfolgte durch Horizontalgelelektrophorese mit 2%igen Agarosegelen unter Zugabe von Ethidiumbromid (Carl Roth, Karlsruhe). Dazu wurde eine der gewünschten Konzentration entsprechende Menge SeaKem® LE Agarose (Biozym, Oldendorf) in einem der benötigten Gelgröße entsprechendem Volumen 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer (s. 8.15.2.1) durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst und nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,25 µg/ml) und Abkühlung auf ca. 65°C in eine an den Enden verschlossene Gelbrücke mit einem Plastikrechen zum Erzeugen von Geltaschen gegossen. Als Längenstandards kamen eine mit dem Restriktionsenzym *MspI* geschnittene pUC19-DNA („pUC19/*MspI*“) (s. 8.1.1), sowie ein laboreigener Längenstandard („MF“, s. 8.1.2) zum Einsatz. Zum Beladen der Geltaschen diente eine mit Farbstoff versetzte 15%ige Ficoll 400 Lösung (Serva, Heidelberg). Die eingesetzten Farbstoffe orientieren sich an der Größe der zu erwartenden Amplifikate, um ein Überdecken der Banden zu vermeiden. Für kleine Amplifikate wurde Xylencyanol (Carl Roth, Karlsruhe) gewählt (Wanderung im 2%igen

Agarosegel auf der Höhe von ca. 800 bp und damit oberhalb der zu erwartenden Amplifikate), für große Amplifikate Bromphenolblau (Carl Roth, Karlsruhe), welches im 2%igen Agarosegel bei ca. 100 bp (und damit unterhalb der zu erwartenden Amplifikate) wandert.

15 µl des PCR-Produkts wurden mit 3 µl Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Gleichzeitig wurde in die erste, bei größeren Probenzahlen zusätzlich auch in die letzte Tasche des Gels der entsprechende Längenstandard zugegeben. Als Laufpuffer diente ebenfalls ein 1x TBE Puffer. Die Elektrophoreseläufe erfolgten bei einer Spannung von 6V/cm, bei einer maximalen Stromstärke von 500 mA (Microcomputer Elektrophoresis Powersupply, Consort, Belgien) für 45 bis 60 Minuten. Zur Dokumentation wurde die DNS mit einem UV-Transluminator (Vilber Loumat, Torcy, Frankreich) bei 312 nm sichtbar gemacht und das Gel mit einem Geldokumentationssystem (Kodak 1.0 „Digital Imaging“) fotografiert und digital archiviert.

Diese Art der Ergebniskontrolle kam, soweit nicht anders angegeben, für alle folgend aufgeführten PCR-Verfahren zu Einsatz.

3.5.2.2 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde als „two step“ RT-PCR durchgeführt. Initial erfolgte die Übersetzung der mRNA in komplementäre DNS (cDNA), welche in einem weiteren Schritt mit der PhusionTM-Polymerase amplifiziert werden konnte. Die Bedingungen der zweiten Amplifikation entsprechen den unter 3.5.2.5 aufgeführten Bedingungen für die PhusionTM-Polymerase.

Die Übersetzung der mRNA in cDNA erfolgte mit der Reversen Transkriptase des Avian Myeloblastoma Virus (AMV-RT, peQLab, Erlangen) unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers (Länge 12 bp).

Genutzt wurde die RT-PCR zur Überprüfung der veröffentlichten Sequenz der C-Region des felines IgM (Cho et al., 1998). Hierbei wurden zur Amplifikation der cDNA die Primer IgMf1 als Sense-Primer und IgMr2 als Antisense-Primer mit einer Anlagerungstemperatur von 54°C eingesetzt.

Nach Auftauen, Mischen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g) wurden folgende Reagenzien in ein PCR-Tube gegeben:

Tabelle 11: Ansatz 1 für die reverse Transkription

Reagenz	Bemerkung	(μ l)
RNS	1 – 5 μ g	1 – 10
cDNA-Synthese-Primer	10 μ M	2
DEPC-H ₂ O		ad 12,5

Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach erfolgte auf Eis die Zugabe folgender Reagenzien:

Tabelle 12: Ansatz 2 für die reverse Transkription

Reagenz	Bemerkung	(μ l)
„5 x Reaktionspuffer“*	5 fach konzentriert	4
dNTPs	jeweils 10 mM	2,5
AMV-RT	25 U/ μ l	1
Gesamtvolumen		20

* vom Anbieter der AMV-RT mitgelieferter Reaktionspuffer.

Die Gefäße wurden gevortext und anzentrifugiert. Dann erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei 55 °C und zur Inaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 65 °C. Die Ansätze wurden entweder sofort amplifiziert oder bei -20 °C maximal 3 Monate gelagert.

3.5.2.3 PCR mit dem SMARTTM RACE Amplification Kit

Das SMARTTM RACE Amplification Kit (BD Biosciences, Heidelberg) ist eine Fusion der MarathonTM cDNA Technologie (Chenchik et al., 1995) mit der SMART (Switching Mechanism At 5' End of RNA Transcript) Methode. Diese Kombination erlaubt die Herstellung qualitativ hochwertiger cDNA aus geringsten Mengen Gesamt- oder polyadeninhaltiger RNS inklusive des 5' und 3' Ende des RNS Moleküls (Rapid Amplification of cDNA Ends = RACE).

Die Besonderheit dieses Systems liegt darin, dass in erster Linie lange cDNA Moleküle angereichert werden.

Die Reaktion beginnt mit einer cDNA-Synthese, die mit speziellen Oligo-dT-Primern (SMART-CDS bzw. 5'-RACE-CDS) aus dem Kit, mit Zufallsprimern oder mit genspezifischen Primern initiiert werden kann. Erreicht die Reverse Transkriptase - in diesem Kit wird die Reverse Transkriptase des Molony Murine Leukemia Virus (MMLV) verwendet - das 5' Ende der mRNA Matrize entfaltet sie terminale Transferaseaktivität. Dies führt dazu, dass an das 5'-Ende der neugeschaffenen cDNA Cytosinreste angehängt werden.

Ein spezielles Oligonukleotid (SMART IITM Oligonukleotid) aus dem Kit hybridisiert an diese Cytosin-Reste und dient der reversen Transkriptase als Matrize für den Einbau weiterer Nukleotide („switching mechanism at 5'end“). Auf diese Weise wird eine bekannte Sequenz der mRNA-Matrize zugefügt, welche als Hybridisierungsstelle für Primer in der weiteren Amplifikation dient.

Das ursprüngliche Protokoll des Herstellers wurde aufgrund von Erfahrungen anderer Mitarbeiter im Labor (Kreuzer, 2005) in einigen Punkten leicht verändert, so kam statt der „PowerScriptTM“ reversen Transkriptase (BD Biosciences, Heidelberg) die „SuperscriptTM II“ reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) zu Einsatz. Weiterhin wurde zur Verhinderung der Zerstörung der RNS der RNase-Inhibitor RNasin[®] (Promega, Mannheim) bei der cDNA-Synthese zugegeben.

Wie alle anderen Oligonukleotide, die zur cDNA-Synthese eingesetzt werden, kann das SMART IITM Oligonukleotid unter Umständen, statt an die Cytosinreste zu binden, ebenfalls an die RNS binden und somit eine cDNA-Synthese initiieren. Bei einer solchen cDNA wäre das SMART IITM Oligonukleotid an einem, die ihm komplementäre Sequenz am anderen Enden integriert. Dieses Molekül würde in weiteren Amplifikationen allein durch den spezifisch gegen die Komplementärsequenz des SMART IITM Oligonukleotids gerichteten Primer vervielfältigt werden. Dies verhindert die so genannte „Step-out“ PCR (Matz et al., 1999). Hierbei wird ein langes Oligonukleotid verwendet, welches im 3' Bereich dem SMART IITM Oligonukleotid entspricht, jedoch im 5' Bereich 20 Basen zusätzlich enthält. Wenn dieses als langer Universalprimer (UPL) bezeichnete Oligonukleotid an ein Konstrukt mit dem SMART IITM Oligonukleotid an beiden Enden bindet, entstehen an beiden Enden des Moleküls komplementäre Sequenzen mit entgegengesetzter Orientierung. Diese lagern sich bei weiteren Zyklen zusammen. Dadurch wird das Molekül zu einer Schleifenbildung gezwungen, die eine weitere Amplifikation verhindert.

Zusätzlich zu dem UPL wird ein kürzerer Primer zugegeben, der dem 5'-Bereich des UPLs entspricht. Dieses kurze Universalprimer (UPS) benannte Oligonukleotid wird in fünffach höherer Konzentration als der UPL zugegeben. Es dient als eigentlicher Amplifikationsprimer für die Vervielfältigung der gewünschten Moleküle mit der Sequenz des UPL an einer und der genspezifischen Sequenz an der anderen Seite. UPL und UPS werden zusammen als Universalprimer-Mix (UPM) benutzt. Soll die Spezifität eines solcherart gewonnenen PCR-Produktes erhöht werden, kann ein gegen das 3'-Ende des UPL gerichteter Primer („nested Universalprimer“, UP-nested) in Kombination mit einem weiter Richtung 5'-Ende gelegenen

genspezifischen Primer eingesetzt werden. Dabei entspricht die Sequenz des UP-nested der des SMART IITM Oligonukleotids.

Ca. 100 ng mRNA dienten als Template für die reverse Transkription. Nach Auftauen auf Eis, Mischen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g), kamen die Reagenzien in folgender Reihenfolge in ein PCR-Tube:

Tabelle 13: Ansatz 1 für die reverse Transkription im Zuge der SMARTTM RACE.

Reagenz	Bemerkung	(µl)
RNS	100 ng	1 – 3
cDNA-Synthese-Primer	20 µM	1
SMART II TM Oligonukleotid	10 µM	1
DEPC-H ₂ O		ad 5

Dieser Ansatz wurde zwei Minuten bei 70 °C inkubiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

Tabelle 14: Ansatz 2 für die reverse Transkription im Zuge der SMARTTM RACE

Reagenz	Bemerkung	(µl)
„5X First-Strand Buffer“ [*]	5 fach konzentriert	2
DTT	0,1 mM	1
RNAsin [®]	40 U/µl	0,5
dNTPs	10 mM	1
Superscript TM II	200 U/µl	0,5
Gesamtvolumen		10

^{*} Bestandteil des SMARTTM RACE Amplification Kits

Nach erneutem Vortexen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g) folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 42 °C. Der Ansatz wurde daraufhin mit 40 µl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Eine folgende Inkubation bei 72 °C diente zur Inaktivierung des Enzyms. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

3.5.2.4 CapFishingTM Technik

Eine weitere Methode zur Amplifikation vollständiger cDNA bietet das CapFishingTM Full-length cDNA Premix Kit (BioCat, Heidelberg). Hierbei kommt ein so genannter CapFishingTM Adapter zum Einsatz.

Nach der cDNA-Synthese, durchgeführt nach Herstellerangaben mit der „SuperscriptTM II“ reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe), bindet ein genspezifischer Primer innerhalb der

mRNA während der CapFishingTM Adapter an die CAP-Struktur am 5'-Ende der vollständigen mRNA bindet. In der weiteren Amplifikation dient die Sequenz des CapFishingTM Adapters der reversen Transkriptase als Matritze, wodurch die komplementäre Sequenz in die cDNA eingebaut wird und als späterer Anlagerungspunkt für die Primer der weiteren Amplifikation dient. Das führt dazu, dass im Endeffekt nur vollständige, d.h. auf die CAP-Struktur enthaltende mRNA-Moleküle zurückgehende cDNA-Moleküle amplifiziert werden. Zur Verhinderung der Degradation der mRNA wurde wiederum der RNase-Inhibitor RNasin[®] hinzugegeben.

Beim CapFishingTM wurden ca. 1 bis 3 µg mRNA für die reverse Transkription eingesetzt. Nach Auftauen auf Eis, Mischen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g), kamen die Reagenzien in folgender Reihenfolge in ein PCR-Tube:

Tabelle 15: Ansatz 1 für die reverse Transkription im Zuge des CapFishingTM.

Reagenz	Bemerkung	(µl)
RNS	1-3 µg	1 – 4,5
dNTPs	10 mM	4
cDNA-Synthesepimer	10 µM	2
DEPC-H ₂ O		ad 10,5

Dieser Ansatz wurde drei Minuten bei 75 °C inkubiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien:

Tabelle 16: Ansatz 2 für die reverse Transkription im Zuge des CapFishingTM.

Reagenz	Bemerkung	(µl)
„5x RT buffer“*	5 fach konzentriert	4
DTT	0,1 mM	1
„CapFishing TM Solution“		1
BSA	1mg/ml	2
RNasin [®]	40 U/µl	0,5
dNTPs	10 mM	1
Superscript TM II	200 U/µl	1
Gesamtvolumen		20

* vom Anbieter der SuperscriptTM II mitgelieferter Reaktionspuffer.

Nach erneutem Vortexen und Anzentrifugieren (3 Sekunden bei 2.000 x g) folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 42 °C. Von dem zuvor drei Minuten bei 75 °C erwärmten und zwei Minuten auf Eis abgekühlten CapFishingTM Adapter wurden 3 µl sowie 0,3 µl der „SuperScriptTM II“ reversen Transkriptase zugegeben. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 42 °C zum Integrieren der Adaptersequenz in die cDNA. Das

Enzym konnte durch eine sich anschließende 15 minütige Inkubation bei 70 °C sowie eine fünfminütige Inkubation bei 94 °C inaktiviert werden. Verdünnt wurde die so entstandene cDNA mit 180 µl DEPC-behandeltem Wasser. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung auf Eis oder bei -20 °C.

3.5.2.5 Amplifikation der cDNA mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase

Um bei der Amplifikation von Sequenzen für die Analyse der Gene des felines Immunglobulins die polymerasebedingten Fehler zu verringern, kam die neu entwickelte Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase (BioCat, Heidelberg) zum Einsatz. Diese Polymerase hat nach Angaben des Herstellers eine fünfzigfach geringere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase und eine sechsfach niedrigere als die *Pfu*-Polymerase. Gleichzeitig bescheinigt der Hersteller ihr eine doppelt so hohe Umsatzgeschwindigkeit wie die der *Taq*-Polymerase. Eine bessere Thermostabilität lässt bei dieser Polymerase eine Denaturierungstemperatur von bis zu 98 °C zu, was ein Fehlanlagern der Primer vermindert. Da die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase eine Polymerase mit Fehlerkorrektur-Aktivität ist, werden hier bei der Amplifikation im Gegensatz zur Amplifikation mit der *Taq*-Polymerase, die Adenin-Überhänge produziert, glatte Enden ohne Adenin-Überhänge erzeugt. Die Zusammensetzung des Mastermix für die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Mastermix für die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase

Reagenz	Konzentration	Pro Ansatz (µl)
DEPC-Wasser		31,5
„5x Phusion HF Buffer“ ¹	5 fach konzentriert	10
dNTPs	jeweils 10 mM	1
Sense-Primer	10 µM	1
Antisense-Primer	10 µM	1
Phusion™	2 U/µl	0,5
cDNA		5,0
Gesamtvolumen		50,0

¹Bestandteil des Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase Kits

Die Reaktionsbedingungen wurden der höheren Thermostabilität der Phusion™ -Polymerase angepasst und sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen für die PCR mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
Denaturierung	30 s	98 °C	-
Schmelzen	10 s	98 °C	35
Anlagern	30 s	Primerabhängig	
Verlängern	30 s	72 °C	
Abschließende Verlängerung	5 min	72 °C	-
Kühlen	Bis zur Entnahme	4 °C	-

Die Amplifikation der cDNA geschah im Falle der SMART™ RACE-Technik und der CapFishing™ Methode als „Seminested“-PCR. Dies bedeutet, dass für die Amplifikation der cDNA jeweils der systemeigene Primer zu Amplifikation der eingebauten Signalsequenzen (UPM, CapFishing™ Adapter) in Kombination mit einem genspezifischen Primer eingesetzt wurde, wobei dieser genspezifische Primer weiter in Richtung 5'-Ende platziert wurde, als der Primer für die cDNA-Synthese.

Um bei der SMART™ RACE-Technik die Spezifität der Amplifikate noch weiter zu erhöhen, schloss sich an die erste Amplifikation eine zweite Reaktion mit dem nested-Universal-Primer und einem noch weiter in Richtung 5'-Ende der DNS gelegenen genspezifischen Primer als dem Primer für die erste Amplifikation an. Dies entspricht einer so genannten „Nested“-PCR.

3.5.2.5.1 Leader-PCR

Die Leader-PCR diente zur Amplifikation der cDNA mit einem Primer mit spezifischer Bindung in der Leaderregion und einem Primer mit Bindung in der C-Region, so dass die vollständigen Gene des variablen Abschnitts der schweren Kette amplifiziert werden konnten. Die Leader-PCR wurde mit den spezifischen Primern für die Leader-Region (IgHV1L für die VH1-Familie, IgHV3L für die VH3-Familie) in Kombination mit dem Antisense-Primer FeIgMrV mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase durchgeführt.

Primer, die gegen die humane Leaderregionen gerichtet sind (HuIgHV2L, HuIgHV4L, HuIgHV5L, HuIgHV6L) (Campbell et al., 1992), wurden ebenfalls in Kombination mit dem Antisense-Primer FeIgMrV eingesetzt und eine Amplifikation mit der Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase versucht.

3.6 Aufreinigung von DNS

Der Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen ging eine präparative Elektrophorese voraus. Diese wurde analog zu den Elektrophoresen zur Ergebniskontrolle (s. 3.5.2.1.1) durchgeführt. Im Unterschied zu der dort aufgeführten Methode wurde aufgrund der Interaktion von Borat

mit subsequenten Reaktionen die Agarose in 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer (s. 8.15.2.2) gelöst und dieser auch als Laufpuffer verwendet. Um eine entsprechen große Menge DNS zu erhalten, wurden 35 µl des PCR-Produkts mit 7 µl Ladepuffer eingesetzt. Die Elektrophoresebedingungen wurden für eine schonende und effektive Trennung der Fragmente mit 3V/cm bei einer maximalen Stromstärke von 500 mA und einer Laufzeit von 90 bis 120 Minuten gewählt. Zusätzlich wurde die Elektrophoresekammer mit Eiswasser gekühlt. Die Sichtbarmachung der DNS erfolgte zum Erhalt der Integrität der DNS auf einem UV-Transluminator (Vilber Loumat, Torcy, Frankreich) bei 254 nm. Konnte durch die Amplifikation der cDNA nur Fragmente unterschiedlicher Länge, sichtbar als Schmier, erzeugt werden, wurde das Gel unterhalb der Fragmente der erwarteten Größe abgeschnitten und in umgekehrter Orientierung noch einmal für die Hälfte der vorher verwendeten Zeit der Elektrophorese unterzogen. Dies führte zu einer Akkumulation der DNS in einer Bande, die ausgeschnitten und weiterverarbeitet werden konnte.

Für die Isolierung der DNS aus den ausgeschnittenen Agaroseblöckchen wurde das NucleoSpin® Extrakt II Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die zugrundeliegende Methode beruht darauf, dass die DNS nach Bindung an eine siliziumhaltige Membran in Anwesenheit chaotroper Salze in mehreren Waschschritten von Kontaminationen (z.B. Protein, RNS) befreit wird. Nach dem Trocknen der Membran wird die DNS mit einem im Kit enthaltenen Eluierungspuffer geringer Salzkonzentration gelöst.

1. Schmelzen der Agarose: Für je 100 mg Gel werden 200 µl des Bindepuffers („NT“) zugegeben und das Agaroseblöckchen bis zum vollständigen Schmelzen (5 bis 10 Minuten) bei 50 °C inkubiert.
2. Binden der DNS: Der Bindepuffer mit der gelösten DNS wird in ein Zentrifugiersäulchen mit der siliziumhaltigen Membran pipettiert. Dieses Zentrifugiersäulchen wird zuvor auf ein Sammelgefäß gesteckt, in welchem sich die flüssigen Anteile des Bindepuffer-DNS-Gemisches durch einminütige Zentrifugation bei 11.000 x g sammeln. Die Flüssigkeit wird verworfen.
3. Waschen: Durch Zugabe von 600 µl eines Waschpuffers („NT3“, ethanolhaltig) und anschließend einminütigem Zentrifugieren bei 11.000 x g wird die Membran gewaschen. Das Trocknen der Membran und die Befreiung von überschüssigem Ethanol wird durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 11.000 x g erreicht. Die Sammelgefäße werden mit dem Durchfluss verworfen und das Zentrifugiersäulchen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt.

4. Lösen der DNS: Zum Lösen der DNS wird die Membran mit 25 bis 50 µl (Menge je nach erwarteter und erwünschter Menge bzw. Konzentration der DNS) eines Eluierungspuffers („NE“) überschichtet, abweichend vom Herstellerprotokoll für eine bessere Lösung drei Minuten (Hersteller: eine Minute) bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert.

Die solcherart gewonnene DNS-Lösung wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

Sollte doppelsträngige DNS direkt aus PCR-Ansätzen gewonnen werden, wurde diesen das doppelte Volumen NT-Puffer zugesetzt und das oben beschriebene Protokoll in Punkt 2 begonnen. Falls das Volumen des Reaktionsansatzes unter 50 µl lag, erfolgte eine Volumenanpassung auf 50 µl mit 1 x Tris-Puffer.

3.7 Klonierung von PCR-Produkten

3.7.1 AccepTorTM Vector Kit

Die Klonierung von PCR-Produkten wurde mit dem AccepTorTM Vector Kit (Novagen, Merck, Darmstadt) durchgeführt.

Der hier für die Klonierung verwendete *E. coli*-Stamm „NovaBlue GigaSinglesTM Kompetente Zellen“ leitete sich vom Sicherheitsstamm K12 ab und wird mit dem Klonierungvektor „pST-Blue-1“ kombiniert.

Das Prinzip des AccepTorTM Vector Kits beruht auf der Ligation eines DNS-Fragments (Insert) mit einzelnen Adenin-Überhängen in den linearisierten Vektor mit einzelnen Uridin-Überhängen.

3.7.2 Agar-Nährböden und Flüssigkulturmedien

Die Herstellung der Agar-Nährböden sowie der Flüssigkulturmedien erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989). Da mit dem verwendeten Vektor eine Ampizillinresistenz auf den Bakterienstamm übertragen wird, wurden die Nährböden und die Kulturmedien mit 100 µg/ml Ampizillin (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt. Durch diese Maßnahme wird ein Wachstum von möglichen kontaminierenden Bakterien minimiert.

Vor dem Ausplattieren der transformierten Bakterien wurden die Nährböden mit 40 µl IPTG-Lösung (23 mg IPTG in 1 ml dest. H₂O) (Carl Roth, Karlsruhe) und 40 µl X-Gal-Lösung (40 mg X-Gal in 1 ml DMF) (Carl Roth, Karlsruhe) überschichtet und bei 37 °C inkubiert.

3.7.3 dATP „Tailing“ der PCR-Produkte

Die Klonierung von mit der *Taq*-Polymerase erzeugten PCR-Produkten mit dem pST-Blue-1-Vektor gelingt durch die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase Adenin-Überhänge zu erzeugen relativ einfach. Bei Produkten, die mit der PhusionTM High Fidelity DNA-Polymerase erzeugt wurden und die aufgrund der Fehlerkorrektur-Eigenschaft dieser Polymerase keine Adenin-Überhänge aufwiesen, war es notwendig, diese Überhänge nachträglich zu erzeugen.

Hierzu wurde mit Hilfe der *Taq*-Polymerase nach Aufreinigung der PCR-Produkte, wie beschrieben unter 3.6, entsprechende Überhänge produziert. Da die Phusion-Polymerase bei Salzkonzentrationen arbeitet, in denen die *Taq*-Polymerase nicht mehr effektiv funktioniert, war der vorangestellte Aufreinigungsschritt nötig.

Zur Erzeugung der Überhänge wurden 30 µl des aufgereinigten PCR-Produkts mit 4 µl des 10fach konzentrierten PCR-Puffers, 3 µl dATP (20 mM) und 3 µl der mit einem Verdünnungspuffer (peQLab, Erlangen) auf 1 U/l verdünnten *Taq*-Polymerase versetzt.

Diese Mischung wurde für 20 Minuten bei 72 °C inkubiert.

3.7.4 Vorbereitung der DNS für die Klonierung

Da der Hersteller für das Klonierungskit AccepTorTM Vector Kit eine Aufreinigung der DNS vor der Ligation empfiehlt, wurde die DNS nach dem dATP „Tailing“ erneut mit dem NucleoSpin[®] Extrakt II Kit (Macherey-Nagel, Düren) (s. 3.6) aufgereinigt.

3.7.5 Ligation und Transformation

Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben durch Mischung von Ligationsmastermix, PCR-Produkt und Klonierungsvektor im in Tabelle 19 beschriebenen Verhältnis.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Ligationsansatzes.

Reagenz	Bemerkung	(µl)
pSTBlue-1	50 ng/µl	1 – 4,5
PCR-Produkt	aufgereinigt	0,5 - 4
Clonables TM 2x Ligation Premix		5
DEPC-Wasser		ad 10

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 16 °C im Wasserbad für ca. zwei Stunden. Der Hersteller gibt im Protokoll eine Inkubationszeit von 30 Minuten an, jedoch kann nach Angaben im Handbuch des Kits die Anzahl der rekombinierten Plasmide durch Verlängerung der Inkubationszeit auf zwei Stunden um das zwei- bis dreifache erhöht werden.

Für die Transformation wurde 1 µl des Ligationsansatzes zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis folgte durch die Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für exakt 30 Sekunden die Transformation der Zellen.

Nach erneuter Inkubation auf Eis für zwei Minuten wurden die Zellen mit 250 µl des im AccepTor[™] Vector Kit enthaltenen „SOC“-Medium (ein Nährmedium zur Erhöhung der Transformationseffizienz der Zellen) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden zweimal 60 µl, zweimal 80 µl, zweimal 100 µl und der verbleibende Rest auf insgesamt sieben der vorbereiteten Agarnährböden ausplattiert. Nach Trocknung erfolgte die Inkubation bei 37 °C über Nacht.

3.7.6 Kolonie-PCR

Fusioniert der vor der Ligation als lineares Molekül vorliegende Vektor ohne Insertion eines Fragmentes, werden zwei Anteile eines die β -Galaktosidase-kodierenden Genes in dem entstehenden ringförmigen Plasmid zusammengebracht. Die so von den Bakterien exprimierte β -Galaktosidase (induziert durch IPTG) setzt das den Agarnährböden zugesetzte X-Gal in einen blauen Farbstoff um, der die Kolonie verfärbt. Bei Insertion eines DNS-Fragmentes in den Vektor, wird dieses genau zwischen die beiden oben genannten Anteile des Galaktosidase-kodierenden Genes integriert und die β -Galaktosidase wird nicht exprimiert. Die Kolonien färben sich nicht blau, sondern bleiben weiß.

Zur Überprüfung der Inserts wurden die weißen Klonen mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers vom Agarnährboden in 3 ml Flüssigkulturmedium überführt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (Janke & Kunkel GmbH, Stauffen) bei 200 rpm inkubiert. 0,5 µl der angereicherten Bakterienkultur wurden in ein PCR-Gefäß mit 9,5 µl DEPC-Wassers verbracht und die Bakterien durch Inkubation bei 94 °C für 10 Minuten abgetötet.

Jeweils 15 µl des in Tabelle 20 beschriebenen Mastermix wurden zu den Bakterien gegeben und eine PCR unter dem jeweiligen Primersystem angepassten Bedingungen wie aus Tabelle 21 ersichtlich durchgeführt.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Mastermix für die Kolonie-PCR

Reagenz	Konzentration	Pro Ansatz (µl)
DEPC-Wasser		9,8
“10 x Reaction Buffer“*	5 fach konzentriert	2,5
MgCl ₂	25 mM	0,5
dNTPs	jeweils 10 mM	1
Sense-Primer	10 µM	0,5
Antisense-Primer	10 µM	0,5
BioTherm™ DNA-Polymerase	5 U/l	0,2
Gesamtvolumen		15

* vom Anbieter der BioTherm™ DNA-Polymerase mitgelieferter Reaktionspuffer

Tabelle 21: Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
Denaturierung	2 min 50 s	94 °C	-
Schmelzen	15 s	92 °C	35
Anlagern	30 s	Primerabhängig	
Verlängern	15 s	72 °C	
Abschließende Verlängerung	5 min	72 °C	-
Kühlen	Bis Entnahme	4 °C	-

Die Ergebniskontrolle der Kolonie-PCR erfolgte wie unter 3.5.2.1.1 beschrieben auf 2%igen Agarosegelen

3.7.7 Anzucht geeigneter Kolonien und Plasmidpräparation

0,5 µl der in der Kolonie-PCR positiven Kolonien wurden aus der ersten Übernachtskultur in 10 ml Flüssigkulturmedium überführt und wiederum über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (Janke & Kunkel GmbH, Stauffen) bei 200 rpm inkubiert.

Von dieser Kultur wurden 4 bis 6 ml zur Plasmidpräparation mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt.

Die zugrundeliegende Methode des Kits beruht darauf, dass die durch alkalische Lyse freigewordene Plasmid-DNS durch differentielle Präzipitation von der genomischen getrennt und analog zum NucleoSpin® Extrakt (s 3.6) nach Bindung an eine siliziumhaltige Membran in mehreren Waschschritten von Kontaminationen (z.B. Protein, RNS) befreit wird. Eluiert wurde die DNS mit dem im Kit enthaltenen Eluierungspuffer.

Dazu wurden die 4 bis 6 ml der Bakterienkultur bei 4.500 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet folgendem Protokoll unterzogen:

1. Alkalische Lyse: Das Pellet wird in 250 µl des Resuspendierungspuffers („A1“) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 250 µl des Lysispuffers („A2“) und vorsichtiges Mischen erfolgt die Lyse der Zellen. Der Lysispuffer wird durch Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer („A3“) neutralisiert und die Bakterienreste für 10 Minuten bei 14.000 x g abzentrifugiert.
2. Binden der Plasmid-DNS: Der Bindepuffer mit der gelösten DNS wird in ein Zentrifugiersäulchen mit der siliziumhaltigen Membran pipettiert. Dieses Zentrifugiersäulchen wird zuvor auf ein Sammelgefäß gesteckt, in welchem sich die flüssigen Anteile des Bindepuffer-DNS-Gemisches durch einminütige Zentrifugation bei 11.000 x g sammeln. Die Flüssigkeit wird verworfen.
3. Erster Waschschrift: Durch Zugabe von 500 µl eines zuvor auf 50 °C erwärmten Waschpuffers („AW“) und anschließendes einminütiges Zentrifugieren bei 11.000 g wird die Membran gewaschen. Der Durchfluss wird verworfen:
4. Zweiter Waschschrift: Ein zweiter Waschschrift erfolgt durch die Zugabe von 600 µl eines zweiten Waschpuffers (A4) und eine sich wiederum anschließende Zentrifugation bei 11.000 x g für eine Minute. Der Durchfluss wird ebenfalls verworfen.
5. Trocknen der Membran: Das Trocknen der Membran wird durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 11.000 x g erreicht. Die Sammelgefäße werden mit dem Durchfluss verworfen und das Zentrifugiersäulchen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt.
6. Lösen der DNS: Zum Lösen der DNS wird die Membran mit 50 µl des Eluierungspuffers (AE) überschichtet, abweichend vom Herstellerprotokoll für eine bessere Lösung drei Minuten (Hersteller: eine Minute) bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert.

Von der solcherart gewonnenen Plasmid-DNS-Lösung wurde photometrisch die Konzentration bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNS-Lösung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt oder für längere Konservierung bei -20 °C eingefroren.

3.7.8 Biologische Sicherheit

Folgend den Vorschriften des Gesetzes zur Regelung der Gentechnik (GenTG) und der Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung - GenTSV) sind die *E. coli* nach der Transformation als gentechnisch veränderte Organismen (GVO) einzustufen. Aufgrund der Unbedenklichkeit des Spenderorganismus (Katze), des inserierten genetischen Materials (schwere Kette des Immunglobulins), des Vektors (pSTBlue) und des Bakterienstammes („NovaBlue GigaSinglesTM Kompetente Zellen“) erfolgte die Einstufung in die Risikogruppe 1. Dementsprechend wurden die Arbeiten mit den transformierten Bakterien bis zur thermischen oder alkalischen Lyse entsprechend den Vorschriften für gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt.

3.7.9 Kontrolle der Plasmide

Eine Größenkontrolle der Inserts in den gewonnenen Plasmiden konnte durch einen Restriktionsverdau des Plasmides mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und anschließender Gelelektrophorese durchgeführt werden. Der Vektor ist solcherart konstruiert, dass die Insertionstelle von Erkennungstellen des *EcoRI* flankiert wird, so dass – bis auf wenige zusätzliche Basenpaare – nur das Insert herausgeschnitten wird. Je nach Konzentration der Plasmid-DNS-Lösung wurden 1 bis 2 µl der Lösung in den Verdau eingesetzt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Mastermix für den Restriktionsverdau (Fortsetzung)

Reagenz	Konzentration	Pro Ansatz (µl)
DEPC-Wasser		20 - 21
„10x Buffer <i>EcoRI</i> “*	10 fach konzentriert	2,5
<i>EcoRI</i>	10 U/l	0,5
Plasmid DNS		1-2
Gesamtvolumen		25

* vom Anbieter des *EcoRI* mitgelieferter Reaktionspuffer

Nach ein bis zweistündiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad erfolgte mit 15 µl die Erfolgskontrolle durch Gelelektrophorese mit 2%igen Agarosegelen, wie beschrieben unter 3.5.2.1.1.

3.8 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzierungsergebnisse

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG Biotech GmbH, Ebersberg. Die Plasmide wurden hierzu mit plasmidspezifischen Rückwärtsprimern sequenziert.

Die Computerauswertung der Ergebnisse erfolgte mit den webbasierten Programmen BLAST®-Search Programm (NCBI, Bethesda, USA), ClustalW (EMBL-EBI, Heidelberg), dem speziell für Antigenrezeptorgene entwickelten V-QUEST (IMTG, Montpellier, Frankreich, (Lefranc et al., 1998)) und dem als Freeware erhältlichen Programm DNAClub (www.geneinfo.net, Genetics & Biotech Information Network).

3.9 Test des diagnostischen Primersystems

Die DNS der zu testenden Proben wurde wie unter 3.3. beschrieben isoliert. Die Art der Fixierung der Proben ist aus Tabelle 59 (Anhang) ersichtlich. Je nach Art der Fixierung wurde die Isolierungsmethode angepasst.

3.9.1 Überprüfung der DNS-Qualität

Um die Qualität der DNS, d.h. den Grad der Degradation der DNS zu überprüfen, wurde zunächst versucht, für jede Probe ein ca. 300 bp-großes Fragment aus dem nicht-rearrangierten Teil des Genoms mit der BioTherm™ DNA-Polymerase zu amplifizieren. Gelang es nicht, ein Fragment dieser Länge zu amplifizieren, erfolgte der Versuch, ein 100 bp-großes Fragment ebenfalls aus dem nicht-rearrangierten Teil des Genoms zu amplifizieren. Bei positiver Amplifikation wurden, falls möglich, 250 ng der DNS der Probe mit den Diagnostikprimern amplifiziert.

Als Primer für diese Fragmente wurden in der Arbeitsgruppe etablierte und an einer Vielzahl von Katzen gestestete Systeme benutzt.

Das Primersystem für das ca. 300 bp-große Fragment bestand aus dem Sense-Primer FCA740-F2 und dem Antisense-Primer FCA740-R2 (Menotti-Raymond et al., 2005). Mit diesen gegen Mikrosatelliten gerichteten Primern können je nach Katze Fragmente von 308 bis 336 bp erzeugt werden.

Der Mastermix und die Bedingungen für diese Reaktion sind in Tabelle 23 und Tabelle 24 angegeben.

Das Primersystem für das 100 bp-Fragment bildete der Sense-Primer glcIVex12f und der Antisense-Primer glcIV12r. Mit diesem in der Arbeitsgruppe entwickeltem System kann ein 100 bp-großer Bereich des Exon 12 der α -Glucosidase der Katze amplifiziert werden (Dr. W. Hecht, persönliche Mitteilung).

Mastermix und Reaktionsbedingungen für dieses System sind ebenfalls in Tabelle 23 und Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Mastermix für die Reaktionen zur Überprüfung der DNS-Qualität

Reagenz	Konzentration	Pro Ansatz (µl)	
		FCA740-F2 / FCA740-R2	glclVex12f / glclV12r
DEPC-Wasser		12,74	17,2
Reaktionspuffer	10 fach konzentriert	2	2,5
MgCl ₂	25 mM	0,5	0,5
dNTPs	jeweils 10 mM	0,4	0,6
Sense-Primer	10 µM	1,6	1
Antisense-Primer	10 µM	1,6	1
Taq-Polymerase	5 U/l	0,16	0,2
DNS	125 ng/µl	1	2
Gesamtvolumen		20	25

Tabelle 24: Reaktionsbedingungen für die PCR für die Reaktionen zur Überprüfung der DNS-Qualität

Reaktionsschritt	Zeit		Temperatur (°C)		Wiederholungen
	FCA740-F2 / FCA740-R2	glclVex12f / glclV12r	FCA740-F2 / FCA740-R2	glclVex12f / glclV12r	
Denaturierung	120 s	180 s	95	94	-
Schmelzen	15 s	60 s	94	94	35
Anlagern	45 s	60 s	59	53	
Verlängern	60 s	60 s	72	72	
Abschließende Verlängerung	10 min	5 min	72	72	-
Kühlen	Bis zur Entnahme		4		-

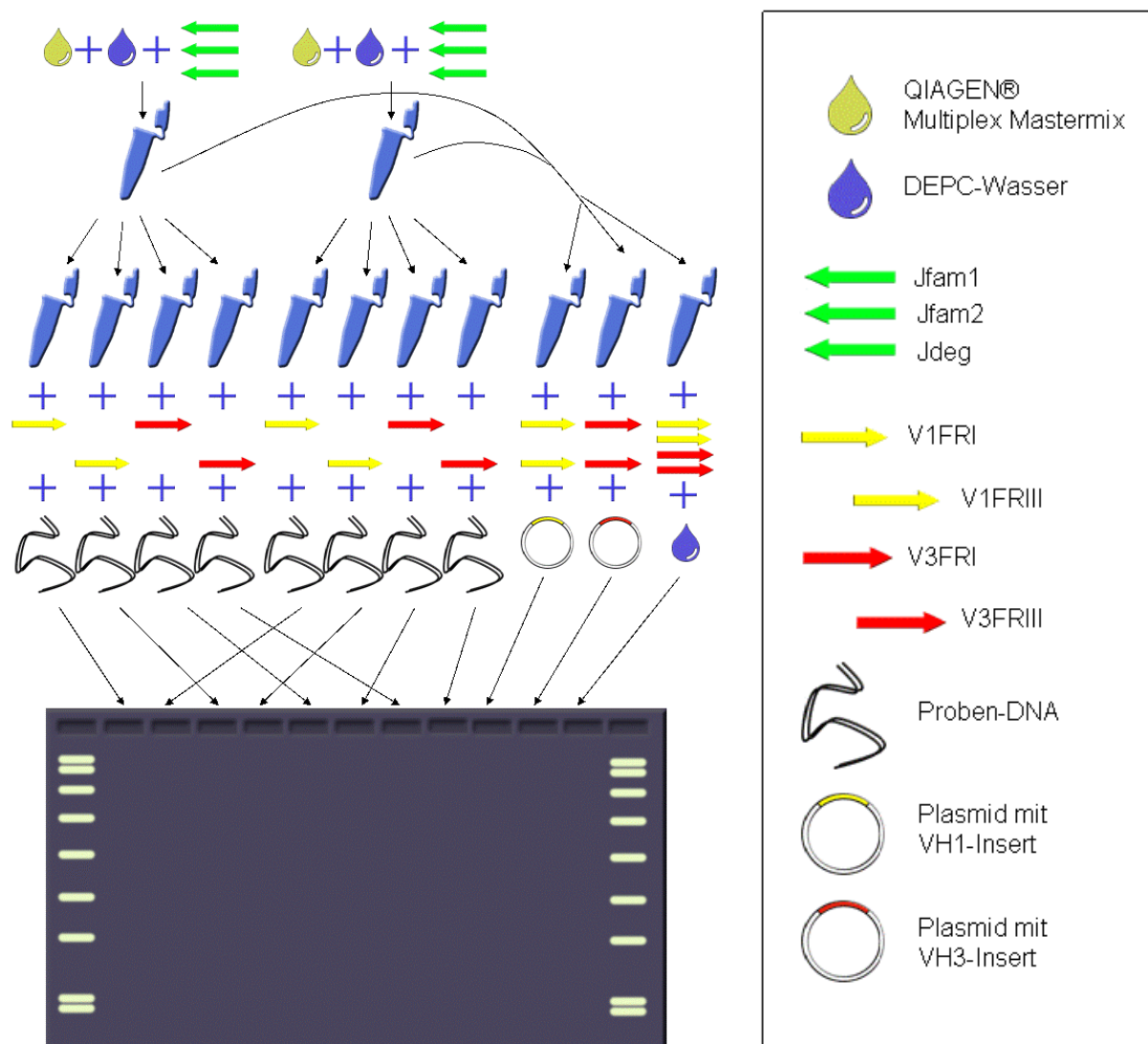
Die Erfolgskontrolle erfolgte wie unter 3.5.2.1.1 beschrieben mittels Elektrophorese auf 2%igen Agarosegelen.

3.9.2 Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des felines Immunglobulins

Die Amplifikation des CDR3 erfolgte durch vier Primersysteme. Pro untersuchte Probe wurden eine Kombination (J-Mix) von drei an identischer Stelle in der J-Region gelegenen Antisense-Primern (Jfam1, Jfam2 und Jdeg, vgl. Tabelle 7) mit je einem familienspezifischen Sense-Primer für den Bereich der Framework-Region 1 und der Framework-Region 3 der V-Region eingesetzt. Dies erfolgte für beide für die Katze identifizierte VH-Familien (s. 4.1.2.2).

Jedes einzelne der vier Systeme wurde im Doppelansatz angesetzt. Hierzu wurden der erste Mastermix sowie die entsprechenden Primer mit optimalerweise 250 ng Proben-DNS vermischt. Hierauf wurde der Reaktionsansatz in einem Block des Thermocyclers platziert und die PCR-Reaktion gestartet. Darauf folgend wurde ein gleichartiger Mastermix angesetzt, wiederum mit den entsprechenden Primern und einer gleichen Menge Proben-DNS versetzt und auf dem zweiten Block des Thermocyclers mit dem gleichen Programm amplifiziert. Für jedes Primerpaar wurde eine Reaktionskontrolle durchgeführt, wobei die jeweiligen Sense-Primer einer Familie (für die Definition der Familien s. 2.5.4.1.3) aufgrund der unterschiedlichen Größe der zu erwartenden Fragmente zusammen in einem Reaktionsgefäß amplifiziert werden konnten. Als Template für die Reaktionskontrolle dienten Plasmide mit Inserts aus der entsprechenden Familie. Weiterhin wurde für die gesamte Reaktion eine Negativkontrolle eingeschlossen. Diese enthielt den Mastermix sowie sämtliche benutzte Primer, jedoch wurde ihr statt DNS DEPC-Wasser zugesetzt. Ein Schema des Reaktionsansatzes ist in Abbildung 6 dargestellt.

Abbildung 6: Schema der Amplifikation des CDR3



3.9.2.1 QIAGEN® Multiplex PCR Kit

Um für die Reaktionskontrolle die simultane Amplifizierung von zwei Fragmenten unterschiedlicher Länge in einem Reaktionsgefäß zu ermöglichen und wegen des Vorteils eines gebrauchsfertigen Mastermix (Mischung aus Polymerase, Reaktionspuffer und Nukleotiden) für die angestrebte routinemäßige Anwendung des diagnostischen Testes, wurde zur Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins das QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

Dieses Kit ermöglicht laut Herstellerangabe eine spezifische und effiziente Amplifizierung von zwei oder mehreren Produkten parallel in einem PCR-Reaktionsgefäß.

Die verwendete Polymerase (HotStarTaq® DNA Polymerase) ist eine so genannte „hotstart“ Taq-Polymerase. Bei dieser Form der Taq-Polymerase liegt das Enzym zunächst als inaktive Form vor und muss erst durch eine initiale Erwärmung auf 95 °C über 15 Minuten aktiviert werden.

Dies verhindert eine Fehlanlagerung der Primer und die Bildung von Primerdimeren während der Vorbereitung der Reaktion und des ersten Denaturierungsschrittes und erhöht damit die Spezifität der Reaktion.

Die Zusammensetzung der Komponenten für die Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins und die Bedingungen für die Reaktion sind in Tabelle 25 und Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Komponenten für die Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins.

Reagenz	Konzentration	Pro Ansatz (µl)
DEPC-Wasser		ad 25
„2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix“*	10 fach konzentriert	12,5
Jfam1	10 µM	0,5
Jfam2	10 µM	0,5
Jfam3	100 µM	0,5
Sense-Primer	10 µM	0,5
Proben-DNS	Je nach Probe	entpr. 250 ng
Gesamtvolumen		25

* Bestandteil des QIAGEN® Multiplex PCR Kits

Die Menge des benötigten DEPC-Wassers orientierte sich an der Konzentration der Proben-DNS. Lag die Konzentration nach Isolierung und Rehydrierung der gefällten DNS

über 125 ng/μl, wurde die DNS auf diese Konzentration verdünnt und 2 μl dieser Verdünnung in die Reaktion eingesetzt. Dementsprechend wurden 8,5 μl DEPC-Wasser eingesetzt. Lag die Konzentration nach Isolierung und Rehydrierung unter 125 ng/μl, wurden das der Menge von 250 ng entsprechende Volumen eingesetzt und dementsprechend das zur Gesamtvolumen von 25 μl fehlende Volumen DEPC-Wasser zugegeben. Das maximal eingesetzbare Volumen Proben-DNS betrug 10,5 μl. In einem solchen Fall wurde kein DEPC-Wasser zugesetzt.

Tabelle 26: Reaktionsbedingungen für die für die Amplifikation des CDR3 der schweren Kette des feline Immunglobulins.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur (°C)	Wiederholungen
Denaturierung (und Aktivierung der Polymerase)	15 min.	95	-
Schmelzen	15 s	92	35
Anlagern	90 s	68,5	
Verlängern	10 s	72	
Abschließende Verlängerung	5 min	72	-
Kühlen	bis Entnahme	4	-

3.9.3 Ergebniskontrolle (SDS-PAGE)

Die Ergebniskontrolle erfolgte als Horizontalgelelektrophorese mit 7%igen Polyacrylamidgelen unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE).

Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm und eine Fläche von 250 mm x 210 mm. Zum Herstellen der Gele wurden 26,25 ml einer 40%igen Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung (Carl Roth, Karlsruhe) mit 30 ml 5x TBE-Puffer und 91,26 ml destilliertem Wasser in einer Saugflasche (Carl Roth, Karlsruhe) vermischt und mittels einer angeschlossenen Vakuumpumpe (KNF Neuberger GmbH, Freiburg) entgast. Nach Zusatz von 1,5 ml 10%iger Natriumdodecylsulfat- (SDS) Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) wurde die Polymerisierung durch Zugabe von 225 μl Tetramethylethyldiamin (TEMED, Carl Roth, Karlsruhe) initiiert und durch Zugabe von 405 μl Ammoniumpersulfat (APS, Roth, Karlsruhe) katalysiert.

Die solcherart vorbereitete Lösung wurde in eine eigens für die horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese entwickelte Gießvorrichtung eingegossen.

Diese Gießvorrichtung bestand aus einem Aluminiumblock mit einer 1,5 mm tiefen Fräsung über die gesamte Fläche des Blockes mit Ausnahme eines schmalen Randes und mehrerer auf einer Seite des Blockes in Reihe angeordneter 1,5 mm hoher Stege, welche zur Erzeugung der Geltaschen dienten (vgl. Abbildung 42, Anhang). Für die Erzeugung der für die Polymerisierung des Polyacrylamids wichtigen anoxischen Bedingungen wurde eine silanisierte Glasplatte der Größe DIN A4 (21 cm x 27,9 cm) (Radeberger Bilderrahmen GmbH, Radeberg) so auf den Gießblock aufgelegt, dass der obere Rand auf den Stegen für die Taschen, aber nicht auf dem oberen Rand des Blockes auflag und somit eine nach drei Seiten offene Konstruktion bildete. Die Glasplatte wurde mit Klemmen befestigt und im Bereich der Stege mit Gewichten beschwert. Zur leichteren Ablösung der Gele vom Gießblock war dieser zuvor mit Silikonlösung (Serva, Heidelberg) silikonisiert worden. Die Gellösung wurde an einer Seite unter die Glasplatte gegossen, wobei durch die nach drei Seiten offene Konstruktion die Bildung von Luftblasen im Gel minimiert wurde.

Nach einer Polymerisierungszeit von ca. 20 bis 30 Minuten konnte das Gel durch vorsichtiges Lösen vom Gießblock entfernt werden, wobei es durch die Silanisierung an der Glasplatte haftete.

Eine ähnliche Methode für die Erzeugung von Polyacrylamidgelen für die Horizontalgelelektrophorese ist beschrieben (Izzo et al., 2006).

Für den Elektrophoreselauf wurde das Gel mitsamt der Glasplatte in eine Elektrophoresekammer der entsprechenden Größe verbracht.

Jeweils 8 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl Ladepuffer (6X Orange Loading Dye Solution, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Gleichzeitig wurde in die erste und die letzte Tasche des Gels der unter 8.1.1 beschriebene pUC 19/*Msp*I-Längenstandard zugegeben. Als Laufpuffer diente ein 1x TBE Puffer.

Der Elektrophoreselauf erfolgte bei einer Spannung von 7,5 V/cm, bei einer maximalen Stromstärke von 500 mA (Microcomputer Elektrophoresis Powersupply, Consort, Belgien) für 9,5 Stunden. Zur Abführung der bei der Elektrophorese entstehenden Wärme wurde die Elektrophoresekammer in einem Kühlschrank bei 4-8 °C gekühlt und über Kabel außen mit Strom versorgt.

Nach Beendigung des Elektrophoreselaufes wurde das Gel mit der Glasplatte in einem Färbebad mit 1 x TBE-Puffer und Ethidiumbromid (0,5 µg/µl) 20 Minuten gefärbt und anschließend 20 Minuten in Leitungswasser entfärbt.

Für die Dokumentation wurde das Gel mit einer Angelschnur (Balzer, Lauterbach) von der Glasplatte abgeschnitten und auf einen UV-Transluminator (Vilber Loumat, Torcy,

Frankreich) verbracht, wo die DNS bei 254 nm sichtbar gemacht und das Gel mit einem Geldokumentationssystem (Kodak 1.0 „Digital Imaging“) fotografiert und digital archiviert werden konnte.

3.9.4 Heteroduplexanalyse

Von Reaktionen, die einer Heteroduplexanalyse unterzogen werden sollten, wurden je 10 µl in ein gesondertes PCR-Tube gegeben und dieses zunächst für 10 Minuten bei 95°C, darauf folgend eine Stunde bei 4°C inkubiert.

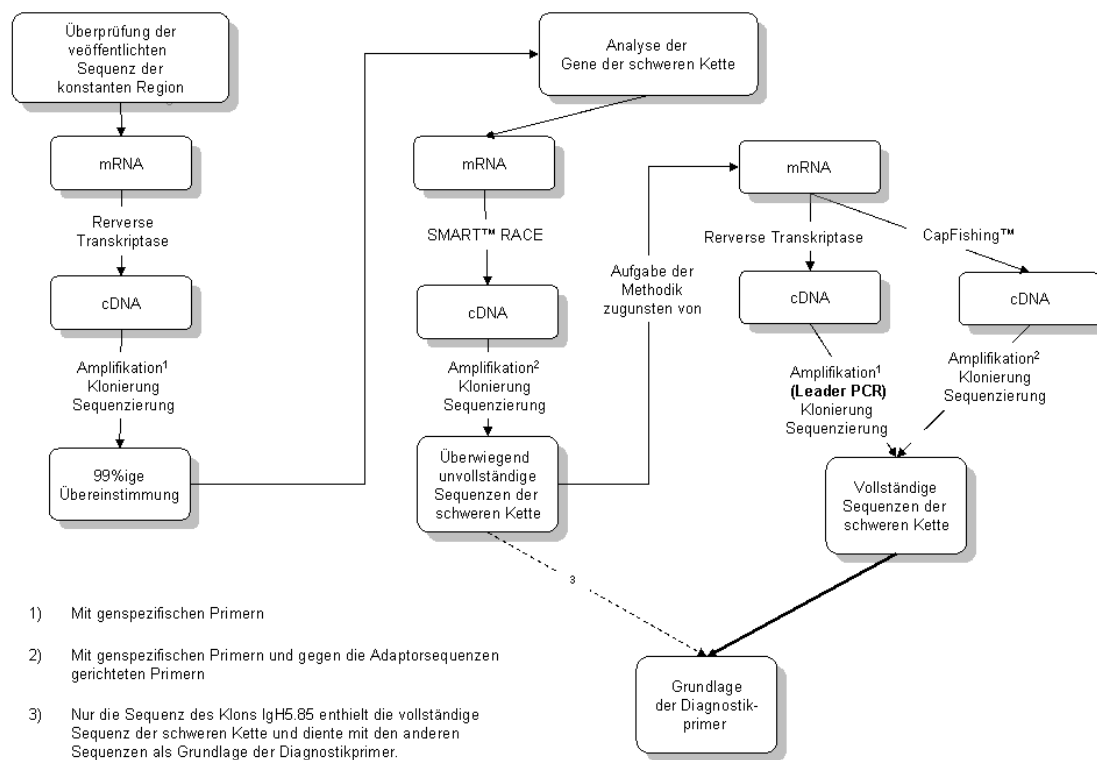
8 µl dieser Reaktion wurden einer Ergebniskontrolle mittels oben beschriebener SDS-PAGE unterzogen.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der schweren Kette des felines Immunglobulins

Für die Analyse der schweren Kette des felines Immunglobulins wurden verschiedene Methoden der Erzeugung von Inserts für die Klonierung und Sequenzierung aus der isolierten mRNA verwendet. Die zunächst verwendete SMART[™] RACE Technik wurde aufgrund geringer Effizienz zugunsten der Leader-PCR und der CapFishing[™] Technik aufgegeben. In Abbildung 7 ist die durchgeführte Strategie der Analyse der schweren Kette schematisch dargestellt.

Abbildung 7: Schema der Strategie der Analyse der schweren Kette



4.1.1 Verifizierung der veröffentlichten Sequenz der C-Region der schweren Kette des feline IgMs

Aufgrund von Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe, die eine Diskrepanz zwischen den veröffentlichten Sequenzen der C-Region des feline TCR- β (Cho et al., 1998) und den eigenen Untersuchungsergebnissen feststellte, wurde die in der selben Arbeit (Cho et al., 1998) veröffentlichte Sequenz der C-Region der schweren Kette des feline IgM am eigenen biologischen Material mittels RT-PCR verifiziert.

Mit dem genspezifischen Primer FeIgMr2 gelang es, cDNA von zwei Katzen (S1234/02 und S902/03) zu gewinnen. Diese wurde mit den Primern FeIgMf1 und FeIgMr2 als spezifischen Primer für die Bindung in der C-Region amplifiziert. Nach Aufreinigung und Klonierung dieser Amplifikate, wurden die Plasmide aus zwei der in der Kolonie-PCR mit den Primern FeIgMf1 und FeIgMr2 positiven Klone sequenziert. Hierdurch konnte ein 764 bp-großes sowie ein 658 bp-großes Fragment identifiziert werden, die jeweils zu 99% mit der veröffentlichten Sequenz übereinstimmten.

4.1.2 Analyse der weiter in Richtung 5'-Ende gelegenen Sequenzen

4.1.2.1 SMARTTM RACE-Technik

Nach Verifizierung der veröffentlichten Sequenz am eigenen Material, wurde diese benutzt, um ausgehend von der C-Region zunächst mittels der SMARTTM RACE-Technik die Bereiche der V-, D- und J-Region zu amplifizieren. Hierzu konnten mit der Sequenz der C-Region als Grundlage neue Primer erstellt und diese für die Reaktion eingesetzt werden.

Als Ausgangsmaterial diente aufgereinigte mRNA des Tieres mit der Tagebuchnummer S897/04.

Zur Initiierung der cDNA-Synthese wurde der Antisense-Primer FeIgMrIV eingesetzt. Die weitere Amplifikation erfolgte als Seminested-PCR mit dem Primer FeIgMrIII und dem Universalprimermix (UPM) bei einer Anlagerungstemperatur von 63°C.

Von den dabei entstandenen Amplifikaten unterschiedlicher Länge wurden die Amplifikate mit einer Größe über 684 bp aufgereinigt und zur zweiten Amplifikation eingesetzt.

Die zweite Amplifikation erfolgte mit dem Nested-Universal-Primer in Kombination mit Primer FeIgMrII bei 63°C Anlagerungstemperatur. Von den Amplifikaten wurden wiederum die Fragmente mit einer Größe über 684 bp aufgereinigt und in kompetente Zellen kloniert.

Von zwei der in der Kolonie-PCR mit dem Primer FeIgMrI (Anlagerungstemperatur 68°C) in Kombination mit dem Nested-Universal-Primer positiven Kolonien (R2.2, R2.6, s. 8.11), wurde das Insert nach Plasmidisolierung sequenziert.

Hierbei ergaben sich eine 275 bp-große und eine 299 bp-große Sequenz, die in ihren letzten 162 Basenpaaren des 3'-Endes zu jeweils 100% mit den ersten 162 Basenpaaren der veröffentlichten Sequenz übereinstimmten. Somit konnte die bekannte Sequenz um 113 bzw. 137 Basenpaare ergänzt werden.

Auf der Basis der erweiterten Sequenz wurden drei Primer erstellt. Der Primer FeIgMfII wurde möglichst nahe an das 5'-Ende der neuen Sequenz platziert und diente als Sense-Primer für den Test der beiden anderen Primer. Die Primer FeIgMrV und FeIgMrVI wurden mit bereits bestehenden Primern zur weiteren SMART[™] RACE-Reaktion und anschließender Klonierung der Produkte für die Analyse der in Richtung 5'-Ende gelegenen Sequenzen eingesetzt. Hier wurde der Primer FeIgMrII zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die erste Amplifikation erfolgte mit dem Primer FeIgMrI in Kombination mit dem UPM (Anlagerungstemperatur 63°C). Die Zweitamplifikation wurde mit dem Primer FeIgMrV in Kombination mit dem Nested-Universal-Primer (Anlagerungstemperatur 63°C) durchgeführt. Von drei der in der Kolonie-PCR mit dem Primer FeIgMrVI in Kombination mit dem Nested-Universal-Primer (Anlagerungstemperatur 68°C) positiven Kolonien wurden die entsprechenden Inserts nach Plasmidisolierung sequenziert (R3.1, R3.2, R3.3, s. 8.11).

Hierbei konnten bei den erhaltenen Sequenzen durch Vergleich mit der Sequenz des humanen Immunglobulins (V-Quest, IMTG, Montpellier, Frankreich) unvollständige Bereiche des CDR3 identifiziert werden.

Beispielhaft ist dies für das Insert des Klons R 3.1 in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8: Äquivalente der Sequenz des Inserts des Klons R3.1 zur humanen Immunglobulinsequenz

1	AAGCAGTGGT	ATCAACGCAG	AGTACGCGGG	CTCCGTGAAG	GGCCGATTCA	CCATCTCCAG
61	AGACAACGCC	AAGAACACGC	TGTATCTGCA	GATGAACAGC	CTGAAGACCG	AGGACACGGC
121	CACATATCAC	TGTTCAAGAG	ATAGCAacta	tgattactgg	ggccaaggag	ccctgatgac
181	ggtGTCCTCA	GAGACCTCAT	CCCGTCCAAA	TCTCTTCCCC	CTCATCACCT	GTGAGAGCTC
241	CCTGTCCGAT	GAGCCCCTGG	TGGCCATGGG	CTGCCTGGCC	CGGGACTTCC	TGCCCAGCTC
301	CGTCACCTTC	TCCTGGAAct	ACAAGAACAA	CAGTGTGGTC	AACAACCA	

AAGCAGTGGT ATCAACGCAG AGTACGCGGG: SMART II™ Oligonukleotid

Entsprechungen zur humanen Sequenz:

GRAU UNTERLEGT: VH3 (unvollständig) kleinbuchstaben: IgHJ4

UNTERSTRICHEN: N-Region GROSSBUCHSTABEN: C-REGION

KURSIV: D5

Bei ca. 300 durch weitere gleichartige SMART™ RACE-Reaktionen erzeugten Klonen konnte lediglich bei einem Klon ein Insert mittels Kolonie-PCR identifiziert werden, das eine einem vollständigen Gen der variablen Region der schweren Kette des Immunglobulins entsprechende Größe aufwies (IgH5.85, s. 8.11). Das Insert dieses Klons wurde sequenziert und mit der humanen Sequenz verglichen (s. Tabelle 62, Anhang).

4.1.2.2 Leader-PCR

Aufgrund der geringen Effizienz der SMART™ RACE-Methode wurde diese aufgegeben und das NCBI Trace Archiv (NCBI, Bethesda) als Grundlage für die Erstellung von Primern für die Amplifikation der vollständigen Sequenz der schweren Kette des felines Immunglobulins herangezogen. Im Trace Archiv konnten 13 Traces der Katze mit signifikanter Ähnlichkeit mit Mitgliedern der humanen VH1-Familie ermittelt werden, von denen mittels V-QUEST (IMTG, Montpellier, Frankreich; (Lefranc et al., 1998)) bei 11 eine über 80%ige Übereinstimmung mit der humanen VH1-Familie gefunden werden konnte. Zum überwiegenden Teil handelte es sich dabei um das Gen IGHV1-24*01. Beim Vergleich der Mitglieder der humanen VH3-Familie mit dem Trace Archiv konnten 145 Traces mit signifikanter Ähnlichkeit ermittelt werden, von denen bei 137 eine über 80%ige Übereinstimmung mit der humanen VH3-Familie ermittelt werden konnte. Der Vergleich der übrigen humanen VH-Familien ergab entweder keine signifikanten Übereinstimmungen mit

den Traces oder die gefundenen Traces konnten mittels V-Quest nicht eindeutig den Genen der schweren Kette zugeordnet werden, so dass lediglich die Traces mit Ähnlichkeiten zur humanen VH1- und VH3-Familie zur weiteren Analyse verwendet wurden. Jedoch wurden Hyperlinks aller Traces, die mittels der Suche gefunden wurden, in einer HTML-basierten Datenbank archiviert.

Durch Analyse auf das Vorhandensein von Leadersequenzen konnten für die VH1-Familie neun Traces ermittelt werden, die eine vollständige Leadersequenz enthielten. Für die VH3-Familie konnten 74 entsprechende Traces ermittelt werden. Mit den auf Grundlage dieser Sequenzen entwickelten Sense-Primern (IgHV3L und IgHV1L) in Kombination mit dem Antisense-Primer FeIgMrV (Anlagerungstemperatur für IgHV1L 62°C, für IgHV3L 65°C) konnten unter Verwendung der Phusion[™] High Fidelity DNA-Polymerase Amplifikate im Größenbereich von 600 Basenpaaren für die jeweiligen Familien erzeugt werden.

Diese wurden aufgereinigt und mittels Klonierung konnten in der Kolonie-PCR mit den Leader-Primern und FeIgMrVI (Anlagerungstemperatur für IgHV1L 62°C, für IgHV3L 65°C) für die VH1-Familie 34 positive Kolonien und für die VH3-Familie 38 positive Kolonien gewonnen werden. Von diesen positiven Kolonien wurden für jede Familie jeweils zehn Inserts nach Aufreinigung der Plasmide sequenziert. Für die VH1- und die VH3-Familie konnten auf diese Weise 9 vollständige Sequenzen der V-Region der schweren Kette des felines Immunglobulins einschließlich der zugehörigen Leader-Sequenz gewonnen werden (Für **VH1**: LV1.1.3, LV1.1.7, LV1.1.9, LV1.1.11, LV1.1.12, LV1.1.33, LV1.1.34, LV1.1.35, LV1.1.37; Für **VH3**: LV3.1.10, LV3.1.11, LV3.1.12, LV3.1.13, LV3.1.33, LV3.1.34, LV3.1.35, LV3.1.36, LV3.1.37) (s. 8.11).

Durch die Analyse der Sequenzen mittels V-Quest konnte auch hier eine Zuordnung der V-, D-, J-, N- sowie der Leader-Region erfolgen.

Abbildung 9 zeigt dies beispielhaft für das Insert des Klons LV1.1.3 (für die Analyse der übrigen Klone s. Tabelle 61 und Tabelle 62, Anhang).

Abbildung 9: Äquivalente der Sequenz des Inserts des Klons LV1.1.3 zur humanen Immunglobulinsequenz

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCTACAGGT	GTGCACTCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCT	GGGGCTGAAG	TGAGGAAGCC	TGAGGCATCA	GTGAAGATCT
121	TCTGCAAAGC	ATCTGGATAC	AGCTTCACTG	ATTACTATAT	GTACTGGGTG	CGACAGGCTC
181	CTGCACAAGG	GTTTGAATGG	ATGGAAGCA	TTGACCCTGA	AGATGGTTCT	ACAAGCTATG
241	CACAGAAGTT	CCAGGGCAGA	CTCACCTGA	CAGCAGACAC	ATCCACAAAC	ACAGCCTACA
301	TGGAGCTGAG	CAGTCTGAGG	TCTACAGACA	CGGCCGTGTA	TTATTGTGCA	AGGTTTGAGT
361	<u>TTAGGGGACT</u>	<u>ATT</u> tatatatt	gactactggg	gccaaaggagc	cctggtgacg	gtGTCCTCAG
421	AGACCTCATC	CCGTCCAAAT	CTCTTCCCC	TCATCACCTG	TGAGAGCTCC	CTGTCCGATG
481	AGCCCCTGGT	GGCCATGGGC	TGCCTGGCCC	GGGACTTCCT	GCCCAGCTCC	GTCACCTTCT
541	CCTGGAAC TA	CAAGAACAAC	AGTGTGGTCA	ACAACCA		

Entsprechungen zur humanen Sequenz:

FETT: Leaderregion	<u>UNTERSTRICHEN: N-Region</u>
GRAU UNTERLEGT: VH1	kleinbuchstaben: IgHJ4
KURSIV: D3	GROSSBUCHSTABEN: C-REGION

Bei dem Versuch der Amplifikation der cDNA mit den Primern gegen die humane Leaderregionen konnten lediglich mit dem Primer HuIgHV2L in Kombination mit FeIgMrV (Anlagerungstemperatur 61°C) Amplifikate erzeugt werden. Die Amplifikate hatten eine Größe von ca. 420 bp. Nach Aufreinigung der Amplifikate, Klonierung, Isolierung und Aufreinigung der Plasmide von fünf in der Kolonie-PCR mit den Leader-Primern in Kombination mit FeIgMrVI positiven Kolonien wurden die Plasmide sequenziert. Die hierbei gewonnenen Sequenzen konnten mittels V-Quest alle der VH3-Familie zugeordnet werden (s. Tabelle 61 und Tabelle 62, Anhang).

4.1.2.3 CapFishingTM-Technik

Die CapFishingTM-Methode wurde parallel zur Leader-PCR eingesetzt. Hierbei wurde die cDNA-Synthese mit Zufallsprimern (N₆) initiiert. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit dem CapFishingTM Adapter in Kombination mit dem sequenzspezifischen Antisense-Primer FeIgMrV. Nach Klonierung des PCR-Produkts, Aufreinigung und Sequenzierung der Inserts konnten so neun zusätzliche Sequenzen gewonnen werden (Cp1.1, Cp1.2, Cp1.4, Cp1.6, Cp1.8, Cp1.9, Cp1.10, Cp1.11, Cp1.13, s. 8.11). Die so gewonnenen Sequenzen waren nochmal ca. 100 bp länger als die mit der Leader-PCR gewonnenen Sequenzen und konnten

nach Überprüfung mittels V-Quest alle der VH3-Familie zugeordnet werden (s. Tabelle 61 und Tabelle 62, Anhang).

4.2 Entwicklung der Diagnostikprimer

4.2.1 Sense-Primer

Durch direkten Vergleich der jeweiligen Sequenzen der beiden bei der Katze gefundenen VH-Familien konnten die Bereiche höchster (CDR, „complimentary-determining regions“) und geringster Variabilität (FR, „framework regions“) zwischen den Sequenzen bestimmt werden. Die entsprechenden Ausschnitte dieses Vergleiches sind in Abbildung 10 bis Abbildung 13 dargestellt.

Abbildung 10: Vergleich der Sequenzen der VH1-Familie (Ausschnitt) mit der Primerbindungsstelle in der Framework-Region 1

	-----FR 1----- -----CDR 1----- -----FR 2-----	
LV1.1.33	TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGCACCTGGTTGCGACAGGCT	179
LV1.1.35	TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGCACCTGGTTGCGACAGGCT	180
LV1.1.34	TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGCACCTGGTTGCGACAGGCT	180
LV1.1.9	TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATCCACTGGTTGCGACAGGCT	180
LV1.1.3	TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGTACTGGGTGCGACAGGCT	180
LV1.1.11	TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGTACTGGGTGCGACAGGCT	180
LV1.1.7	TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGTACTGGGTGCGACAGGCT	180
LV1.1.37	TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGTACTGGGTGCGACAGGCT	180
LV1.1.12	TTCTGCAAAGCGTCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATCGCTGGTGGTGACAGGCC	179
CONSENSUS	TTCTGCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATGYACTGGKTGCGACAGGCT	
V1FRI	GCAAAGCATCTGGATACAGCTTCACTGATTACTATATCGCTGGTGGTGACAGGCC	

Abbildung 11: Vergleich der Sequenzen der VH1-Familie (Ausschnitt) mit der Primerbindungsstelle in der Framework-Region 3

	-----FR3-----	
LV1.1.33	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC	299
LV1.1.35	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC	300
LV1.1.34	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC	300
LV1.1.9	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC	300
LV1.1.3	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC	300
LV1.1.11	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC	300
LV1.1.7	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC	300
LV1.1.37	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC	300
LV1.1.12	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAGACACAGCCTAC	295
CONSENSUS	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTAC	
V1FRIII	GAAAGTTCCAGGGCAGACTCACCCCTGACAGCAGACACATCCACAGACACAGCCTAC	

Abbildung 12: Vergleich der Sequenzen der VH3-Familie (Ausschnitt) mit der Primerbindungsstelle in der Framework-Region 1

	FR 1	CDR 1	FR 2	
LV3.1.33	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
LV3.1.35	ACCTGTGTGGCCTCTGGGTTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
LV3.1.36	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	171
LV3.1.34	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
LV3.1.37	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
LV3.1.13	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
LV3.1.11	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	177
LV3.1.10	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
LV3.1.12	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
IGH5.85	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	125
Cp1.9	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
Cp1.13	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
Cp1.1	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	175
Cp1.8	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
Cp1.10	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
Cp1.11	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
Cp1.2	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
Cp1.4	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	42
Cp1.6	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	178
CONSENSUS	ACCTGTGTGGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	TGGGT	CCGCCAGGCT	
V3FRI	GTGGCCTCTGGATTACACCTTC			

Abbildung 13: Vergleich der Sequenzen der VH3-Familie (Ausschnitt) mit der Primerbindungsstelle in der Framework-Region 3

	FR3	
LV3.1.33	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
LV3.1.35	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
LV3.1.36	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	291
LV3.1.34	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	295
LV3.1.37	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	295
LV3.1.13	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
LV3.1.11	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	297
LV3.1.10	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
LV3.1.12	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
IGH5.85	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	245
Cp1.9	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
Cp1.13	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
Cp1.1	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	295
Cp1.8	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
Cp1.10	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
Cp1.11	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
Cp1.2	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
Cp1.4	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	162
Cp1.6	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	298
CONSENSUS	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACACCTTCAGTAGCTATGAAATGAAC	
V3FRIII	CCGTGAAGGGCCGATTAC	

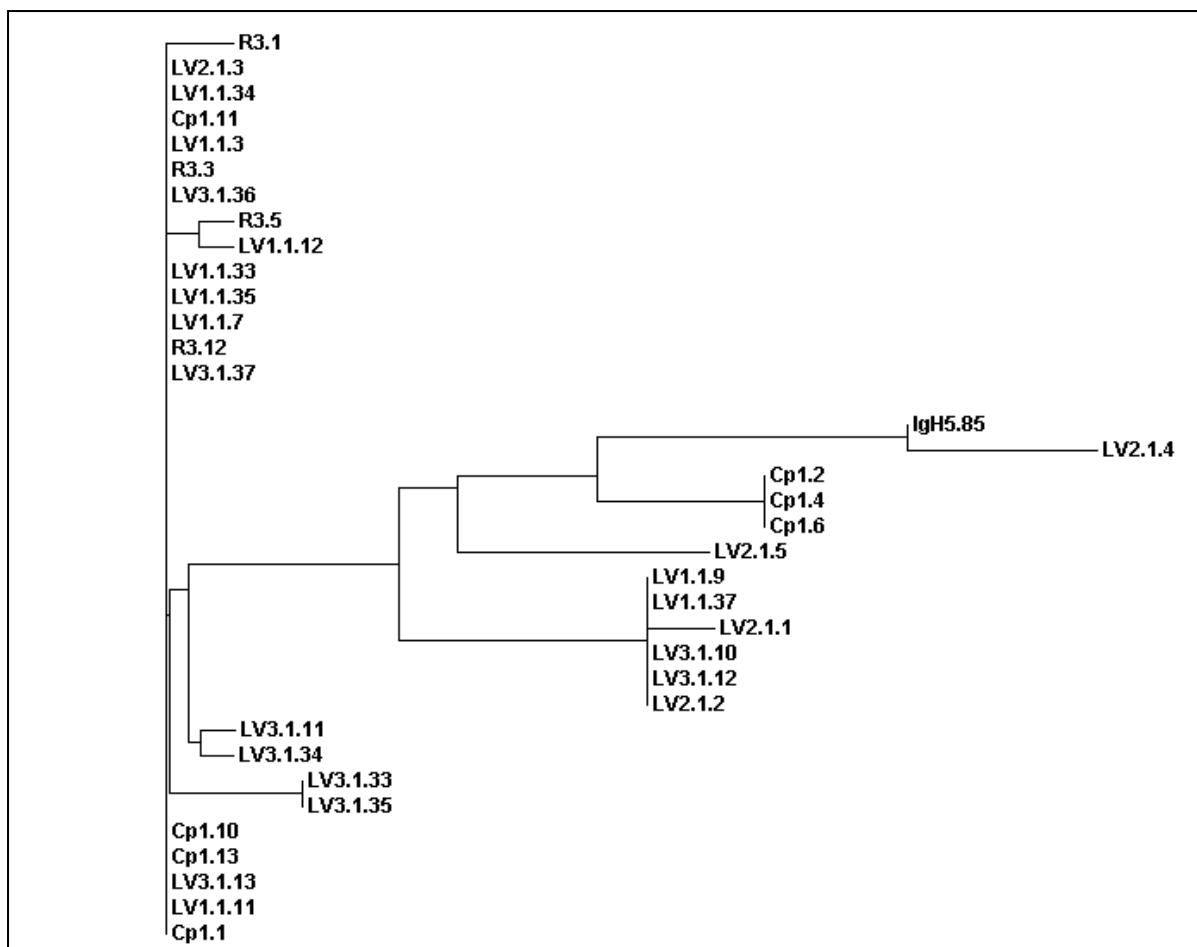
Die familienspezifischen Sense-Primer für die Diagnostik wurden jeweils für die Bindung an Stellen geringer Variabilität in Framework-Region 1 und Framework-Region 2 entwickelt.

4.2.2 Antisense-Primer

Für die Entwicklung der Antisense-Primer wurden die einzelnen in den erzeugten Sequenzen ermittelten J-Regionen mittels des webbasierten Programms ClustalW miteinander verglichen

und ein Verwandtschaftsdiagramm erstellt (vgl. Abbildung 14). In diesen Vergleich wurden auch Sequenzen einbezogen, die nicht für die Entwicklung der Sense-Primer benutzt wurden, weil die V-Region nur unvollständig erfasst wurde.

Abbildung 14: Verwandtschaftsverhältnisse der in den Inserts vorkommenden J-Regionen



Entsprechend der Ähnlichkeit der Sequenzen wurden diese zu Gruppen zusammengefasst und für jede Gruppe eine möglichst alle Mitglieder erfassende Sequenz für den Antisense-Primer ermittelt (sog. „Consensus-Sequenz“) (vgl. Abbildung 15 bis Abbildung 17).

Abbildung 15: Gruppe 1 der J-Regionen

R 3.1	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
R 3.3	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
R 3.5	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
R 3.12	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV1.1.3	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV1.1.33	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV2.1.3	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV3.1.37	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV3.1.33	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGATATCCTCAGA
LV1.1.12	TACTGGGGCCCAAGGAGTCTCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV1.1.7	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV1.1.34	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV3.1.13	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
Cp1.1	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
Cp1.11	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV1.1.11	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV1.1.35	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV3.1.35	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGATATCCTCAGA
LV3.1.36	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
Cp1.10	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
Cp1.13	TACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV3.1.11	AACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
LV3.1.34	CACTGGGGCCCAAGGAGCCCTGGTGACGGTGTCCTCAGA
Consensus	CAAGGAGCCCTGGTGACGGTG

Abbildung 16: Gruppe 2 der J-Regionen

LV1.1.9	TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA
LV2.1.1	TACTGGGGTCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA
LV2.1.2	TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA
LV1.1.37	TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA
LV3.1.10	TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA
LV3.1.12	TACTGGGGCCCCGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCAGA
Consensus	CCCCGGGACCCTGGTCACCGTG

Abbildung 17: Gruppe 3 der J-Regionen

IgH 5.85	ATCTGGGGCCCAAGGTACCCAGGTACCGTCTCCCAAGA
LV2.1.4	ATCTGGGGCCCAAGGTACCCAGGTACCGTCTCCCAAGA
Cp1.2	TTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGA
Cp1.4	TTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGA
Cp1.6	TTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGA
LV2.1.5	CTCTGGGGCCATGGAACCATAGTCACAGTGTCCTCAGA
Consensus	CADGGHACCCWRGTCACCGTS

In Gruppe 3 wurden alle J-Regionen zusammengefasst, die nicht in eine der beiden anderen Gruppe eingeordnet werden konnten. Für diese Gruppe wurde eine so genannte „degenerierte“ Consensus-Sequenz ermittelt. Diese Sequenz enthält alle an einer Lokalisation vorkommenden Nukleotide und wird im so genannten „ambiguity code“ notiert. Ein aus einer solchen Sequenz abgeleiteter Primer wird als „degenerierter Primer“ bezeichnet und stellt eine Mischung aus Primern mit den entsprechend unterschiedlichen Nukleotiden dar. Auf Basis der Sequenzen der Gruppen 1-3 wurden die Antisense-Primer „Jfam1“, „Jfam2“ und „Jdeg“ entwickelt. Da diese Primer exakt an derselben Lokalisation in der J-Region binden, konnten sie als Mischung („J-Mix“) zur Amplifikation eingesetzt werden, wobei der Primer „Jdeg“ in

zehnfach höherer Konzentration eingesetzt wurde, weil dieser als degenerierter Primer schon eine Mischung aus vielen verschiedenen Einzelprimern darstellt.

4.2.3 Überprüfung der Primer

Zur Überprüfung der Primer wurden die aufgereinigten Plasmide mit den Sense-Primern für beide Familien in Kombination mit den Antisense-Primern für die J-Region amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27 Ergebnisse der Amplifikation der Plasmide mit den Diagnostikprimern

Klon	V1FRI	V1FRIII	V3FRI	V3FRIII
LV1.1.3	+	+	-	-
LV1.1.7	+	+	-	-
LV1.1.9	+	+	-	-
LV1.1.11	+	+	-	-
LV1.1.12	+	+	-	-
LV1.1.33	+	+	-	-
LV1.1.34	+	+	-	-
LV1.1.35	+	+	-	-
LV1.1.37	+	+	-	-
IgH5.85	-	-	+	+
LV3.1.10	-	-	+	+
LV3.1.11	-	-	+	+
LV3.1.12	-	-	+	+
LV3.1.13	-	-	+	+
LV3.1.33	-	-	+	+
LV3.1.34	-	-	+	+
LV3.1.35	-	-	+	+
LV3.1.36	-	-	+	+
LV3.1.37	-	-	+	+

+ = Amplifikation; - = keine Amplifikation

4.3 Etablierung des Diagnostik-Systems

4.3.1 Elektrophorese

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde als Horizontalgelelektrophorese durchgeführt. Die Gele wurden mit dem unter 3.9.3 beschriebenen Aluminiumgießblock erzeugt. Die ursprüngliche Intention, die Gele auf UV-durchlässiges Glas aufzubringen, um die solcherart stabilisierten Gele sicherer auf dem Transluminator fotografieren zu können, musste nach einigen Vorversuchen fallen gelassen werden, da selbst sehr UV-durchlässiges Glas die Leuchtstärke der Banden verringerte und so eine Detektion von schwachen Banden erschwert hätte.

Zur Lösung der Gele wurde daher eine straff gespannte Angelschnur zwischen Gel und Glasplatte gleichmäßig vom unteren Ende der Gele bis zum oberen Rand gezogen, wodurch

das Gel von der Glasplatte abgeschnitten werden konnte. Essentiell war dabei, dass die Angelschnur tatsächlich straff gespannt war, denn bei Nachlassen der Spannung war die Gefahr gegeben, dass Reste des Gels mit darin enthaltener DNS auf der Glasplatte zurückblieben.

Die besten Trennergebnisse für die erwarteten Fragmente konnten bei einer Polyacrylamidkonzentration von 7% und einer Spannung von 7,5 V/cm Elektrodenabstand bei einer Laufzeit von 9,5 Stunden erzielt werden.

4.3.2 Isolierung der Proben-DNS

Ausgehend von der Art der Proben wurden unterschiedliche Verfahren zur Extraktion der DNS angewendet. Untersucht wurden Proben von histologisch und immunhistologisch diagnostizierten B-Zell-Lymphomen, T-Zell-Lymphomen sowie lymphatischen Hyperplasien. Die Ergebnisse der Überprüfung der DNS-Qualität sowie die Art der Fixierung und die Isolierungsmethode aller Proben sind in Tabelle 59 angegeben.

4.3.2.1 Frischmaterial

Die Extraktion von Frischmaterial wurde hauptsächlich für die Gewinnung von Ausgangsmaterial für die Analyse der Gene der schweren Kette des felines Immunglobulins eingesetzt. Jedoch konnte auch die DNS eines histologisch diagnostizierten B-Zell-Lymphoms (Tagebuchnummer S1003/04) erfolgreich mit Hilfe des Protokolls für Frischmaterial des Extraktionskits Puregene® DNA Purification Kit gewonnen werden. Die DNS wies eine gute Amplifizierbarkeit im Bereich von 300 bp auf.

4.3.2.2 Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe

Für dieses Gewebe wurden zwei Methoden angewandt. Die zunächst verwendete Methode orientierte sich an dem Protokoll des Puregene® DNA Purification Kits zur DNS-Extraktion aus formalinfixiertem paraffineingebetteten Gewebe. Mit diesem Verfahren wurden 36 Proben extrahiert und die Qualität der DNS (s. 3.9.1) zunächst durch den Versuch der Amplifikation eines ca. 300 bp-großen Fragments überprüft. Von 36 Proben konnte bei elf Proben ein Amplikon dieser Länge erzeugt werden. Bei den 25 negativen Proben schloss sich der Versuch an, ein Fragment der Länge von 100 bp zu erzeugen. Dies gelang bei acht der Proben.

Aufgrund der geringen Effizienz dieser Methode wurden folgend 54 Proben mit einer Kombination aus Hitzebehandlung in Natronlauge mit Tween® 20, Bindung an Chelex 100 und Waschen mit Chloroform extrahiert.

Der Versuch der Amplifikation des ca. 300 bp-großen und des 100 bp-großen Fragmentes misslang zunächst, durch zweimaliges Wiederholen des Waschens mit Chloroform konnte jedoch bei 12 der 54 Proben ein Amplikon der Länge von 300 bp erzeugt werden. Bei 38 der 42 negativen Proben gelang folgend die Amplifikation des 100 bp Fragmentes.

4.3.3 Amplifikation des CDR3

Die Amplifikation des CDR3 mit den Diagnostikprimern wurde wie unter 3.9.2 beschrieben durchgeführt. Zur Überprüfung der Wirksamkeit des Systems wurde die DNS von jeweils zehn B-Zell-Lymphomen, zehn lymphatischen Hyperplasien und zehn T-Zell-Lymphomen mit dem System amplifiziert.

Die Tagebuchnummern der verwendeten Proben sind in Tabelle 1 bis Tabelle 3 aufgeführt. Die Auswahl der Proben aus der Gesamtheit der isolierten Proben orientierte sich an der Qualität der DNS. Bevorzugt wurden Proben amplifiziert, bei denen das 300 bp-Fragment amplifiziert werden konnte.

4.3.4 Heteroduplexanalyse

Die Heteroduplexanalyse wurde bei Proben durchgeführt, die Banden gleicher Größe in beiden Reaktionen des Doppelansatzes zeigten.

4.3.5 Ergebnisse der mit dem Diagnostiksystem untersuchten Proben

4.3.5.1 B-Zell-Lymphome

4.3.5.1.1 Fälle 3020/92 und 3597/06

Abbildung 18: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 3020/92 und 3597/06

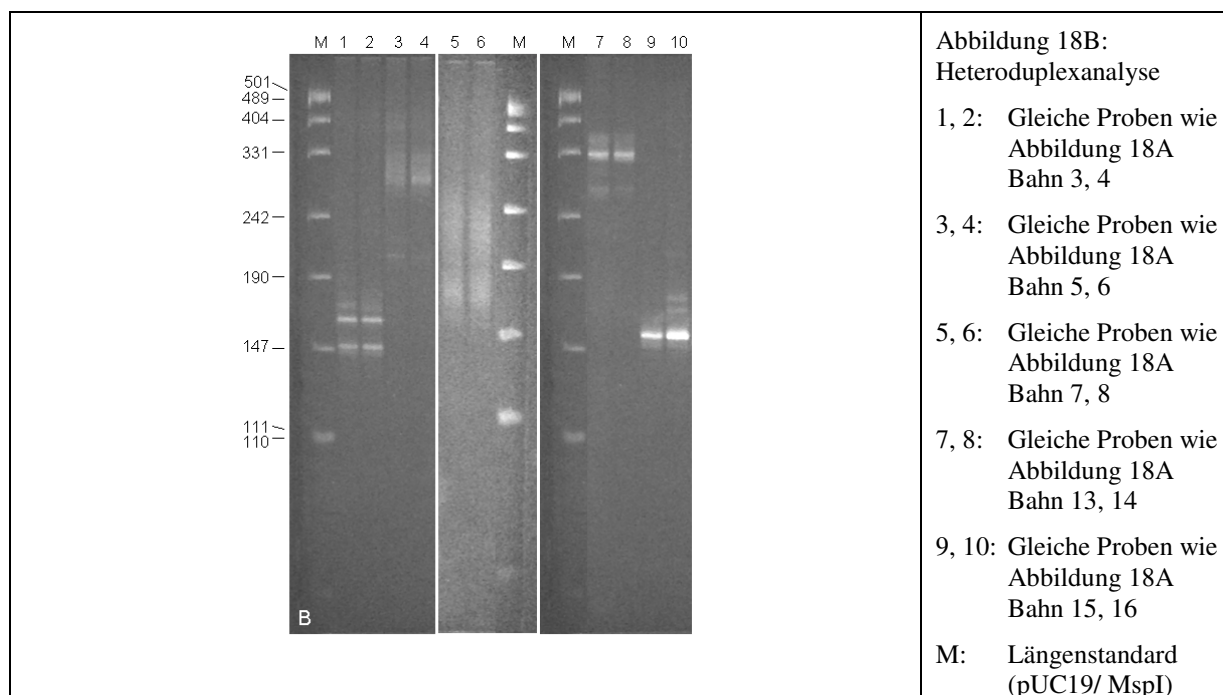
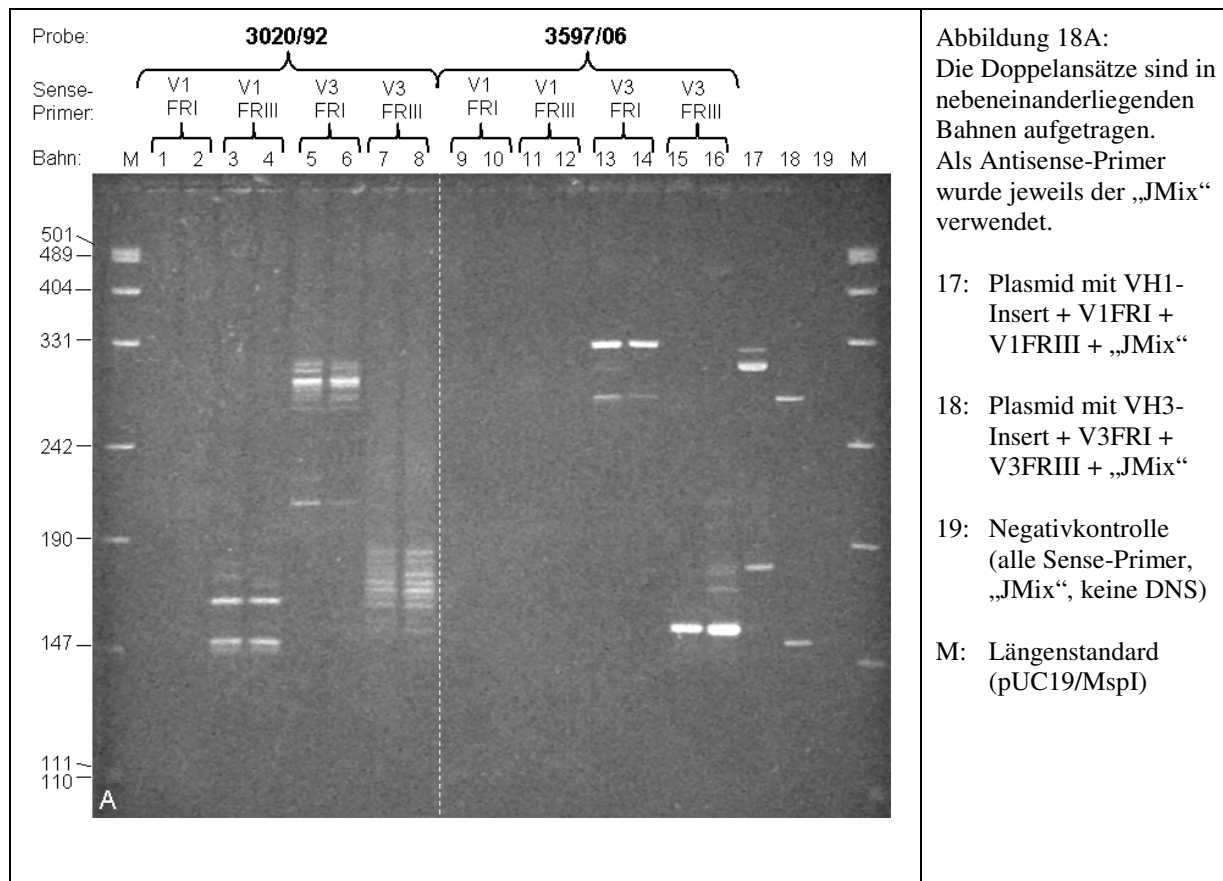


Tabelle 28: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 3020/92

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 18A, Bahn 1 + 2)	Zwei reproduzierbare* Banden sowie 6 bis 7 nicht reproduzierbare schwache Banden (Abbildung 18A, Bahn 3 + 4) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbaren Banden bleiben bestehen (Abbildung 18B, Bahn 1 + 2).	Leitermuster aus 10 bis 12 Banden, die im mittleren Abschnitt eine höhere Fluoreszenz aufweisen (Abbildung 18A, Bahn 5 + 6). <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die stärkere Fluoreszenz im mittleren Bereich ist verschwunden, das Leitermuster ist unscharf (Abbildung 18B, Bahn 3 + 4).	Leitermuster aus 12 bis 14 Banden (Abbildung 18A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 18B, Bahn 5 + 6)

* d.h. in beiden Doppelansätzen auf gleicher Höhe vorhanden.

Tabelle 29: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 3597/06

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 18A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 18A, Bahn 11 + 12)	Zwei reproduzierbare Banden und 1 bis 2 nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 18A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbaren Banden bleiben bestehen (Abbildung 18B, Bahn 7 + 8).	Eine reproduzierbare Bande und 3 bis 4 nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 18A, Bahn 15 + 16) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande bleibt bestehen (Abbildung 18B, Bahn 9 + 10).

4.3.5.1.2 Fälle T383/05 und T1528/07

Abbildung 19: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T383/05 und T1528/07

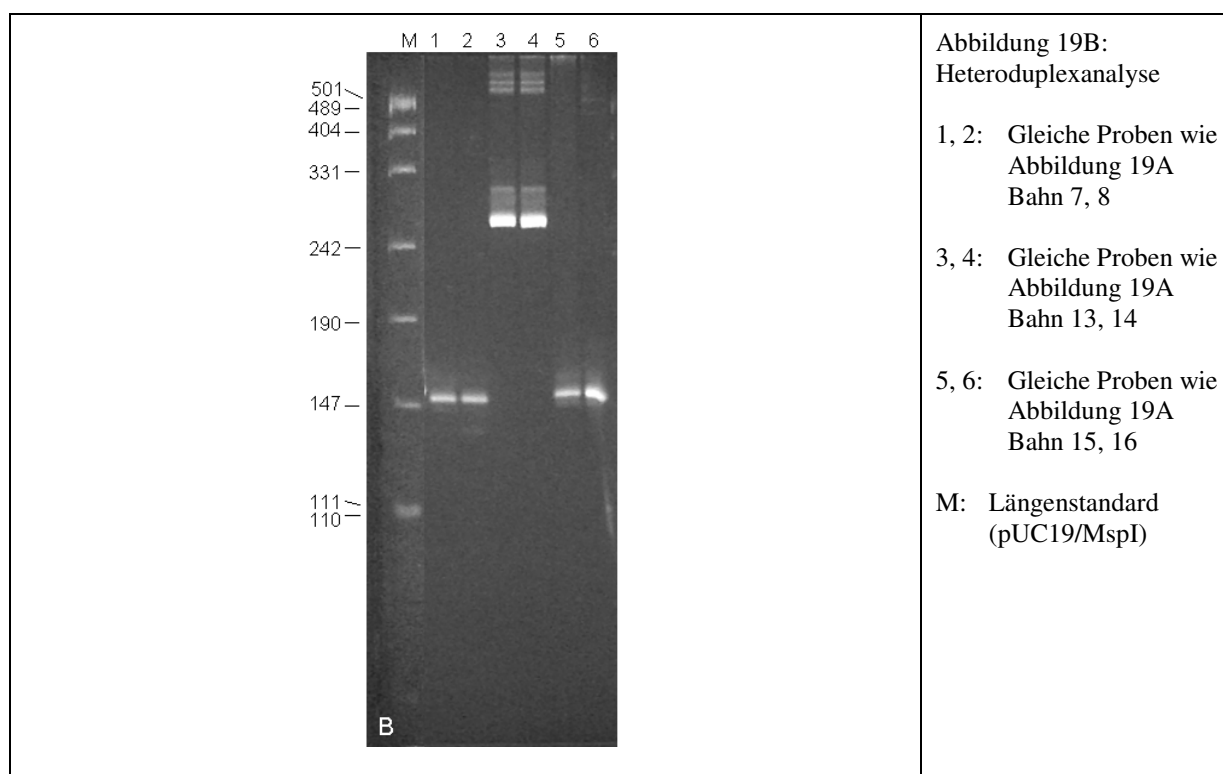
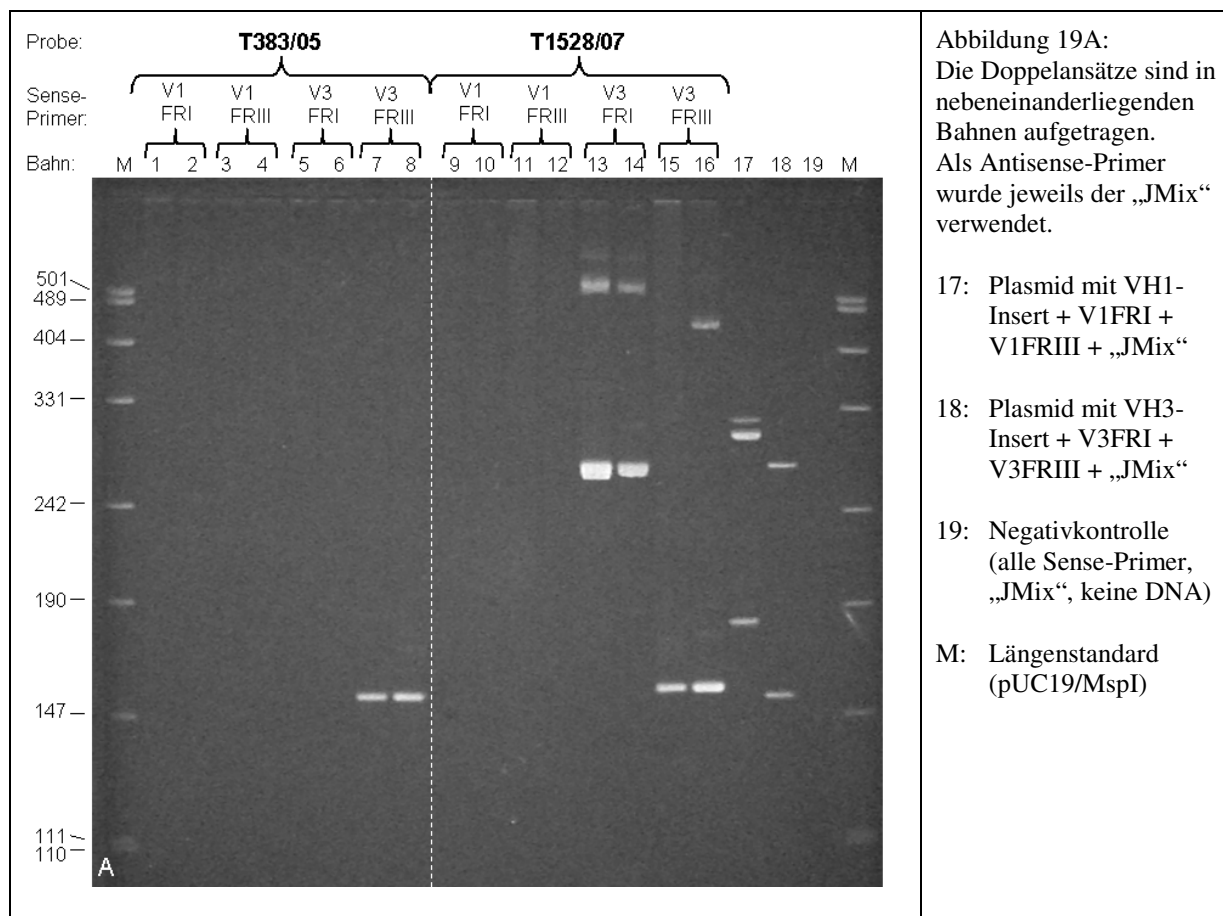


Tabelle 30: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T383/05

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 3 + 4)	Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 5 + 6)	Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 19A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande bleibt bestehen (Abbildung 19B, Bahn 1 + 2).

Tabelle 31: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T1528/07

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 19A, Bahn 11 + 12)	Eine reproduzierbare Banden im erwarteten Größenbereich, eine reproduzierbare Bande oberhalb des erwarteten Größenbereichs (Abbildung 19A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande im erwarteten Größenbereich bleibt bestehen (Abbildung 19B, Bahn 3 + 4).	Eine reproduzierbare Bande im erwarteten Größenbereich, eine nicht reproduzierbare Bande oberhalb des erwarteten Größenbereichs (Abbildung 19A, Bahn 15 + 16) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande im erwarteten Größenbereich bleibt bestehen (Abbildung 19B, Bahn 5 + 6).

Zur Überprüfung der in Abbildung 19A in Bahn 13 und 14 sichtbaren Banden im Größenbereich von 500 bp wurde ein Aliquot der Probe mittels präparativer Elektrophorese aufgetrennt, die DNA aus den entsprechenden Banden aufgereinigt (s. 3.6) und sequenziert. Die Sequenz ist in Abbildung 20 dargestellt und zeigt rearrangierte Immunglobulingene im Bereich des 5'-Endes und Teile einer nicht rearrangierte J-Region im Bereich des 3'-Endes (Situation vor dem Spleißen).

Abbildung 20: Sequenz der bei der Untersuchung von Fall T1528/07 aufgetretenen Nebenbande

1	GTGGCCTCTG	GATTCACCTT	CAGTAGCTAC	TACATGAGCT	GGGTCCGCCA	GGCTCCAGGG
61	AAGGGGCTGC	AGTGGGTCGC	ATATATTAGT	AGTAGTGGAG	GTAGCATATA	CTACGCAGAC
121	TCCGTGAAGG	GCCGATTCAC	CATCTCCAGA	GACAACGCCA	AGAACACGCT	GTATCTGCAG
181	ATGAACAGCC	TGAAGACCGA	GGACACGGCC	ACATATTACT	GTGC	TCGGGG
241	gactcctggg	gcccaaggagc	cctggtgacg	GTGTCCTCAG	GTGAGTCCTC	CCGGCTTTCC
301	TCTCCTCTCT	CTGTCGGGAG	GTTTGGCTG	CATTGGGGA	GAAAACGGAG	GGTGCCAGGG
361	TCTCGGACCT	AGGGCTGGCT	TGGTGGCCAG	GCTCTCCGGG	GACCTCAGCC	ACCCTCAGCT
421	TCAGGGGCCA	CCTGGTCCTC	TCAGCCTCAC	TGGCTGTGAT	CTGAGGTGGA	CCGAGGCCTT
481	AGCCAGGCCC	C	ACTTCTTGT	CTGGGGCCCC	ACCAACATTG	TCA
541	caactactgg	ggccacggaa	ccct			acaactggtt

GRAU UNTERLEGT: V-Region

UNTERSTRICHEN: N-Region

KURSIV: D-Region

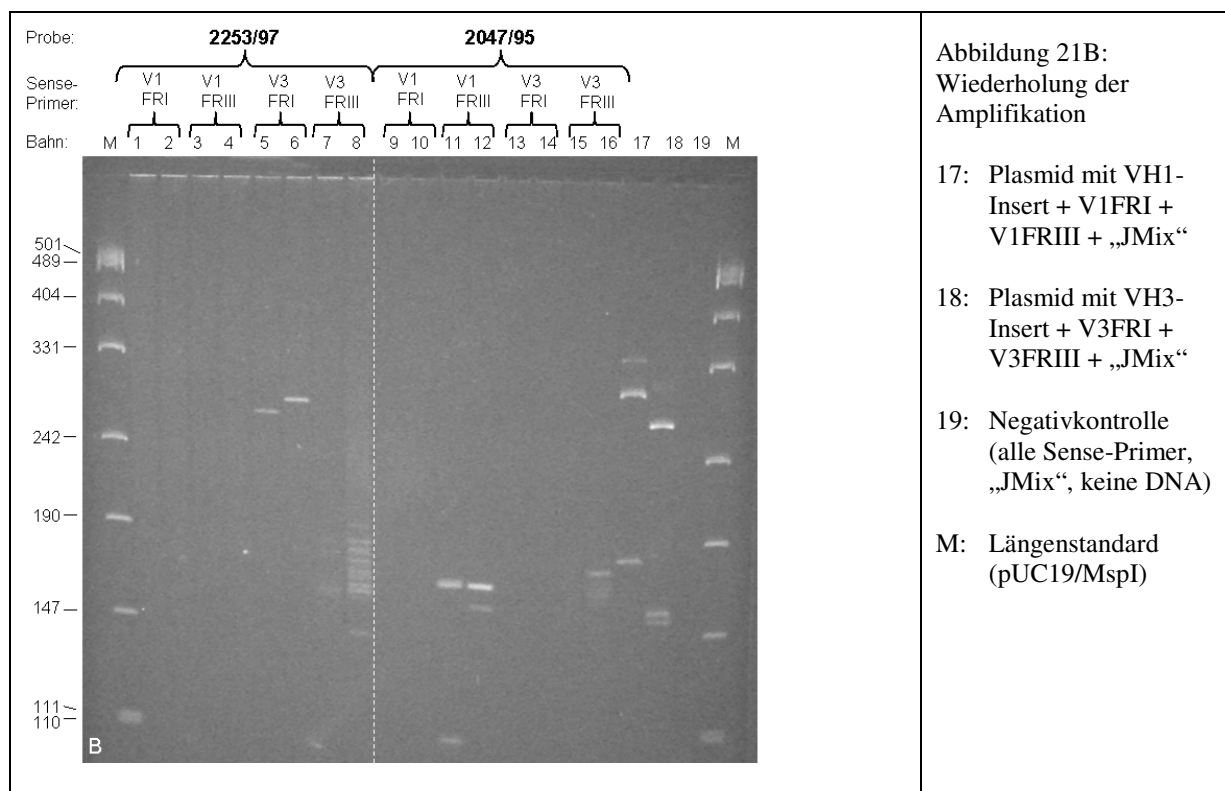
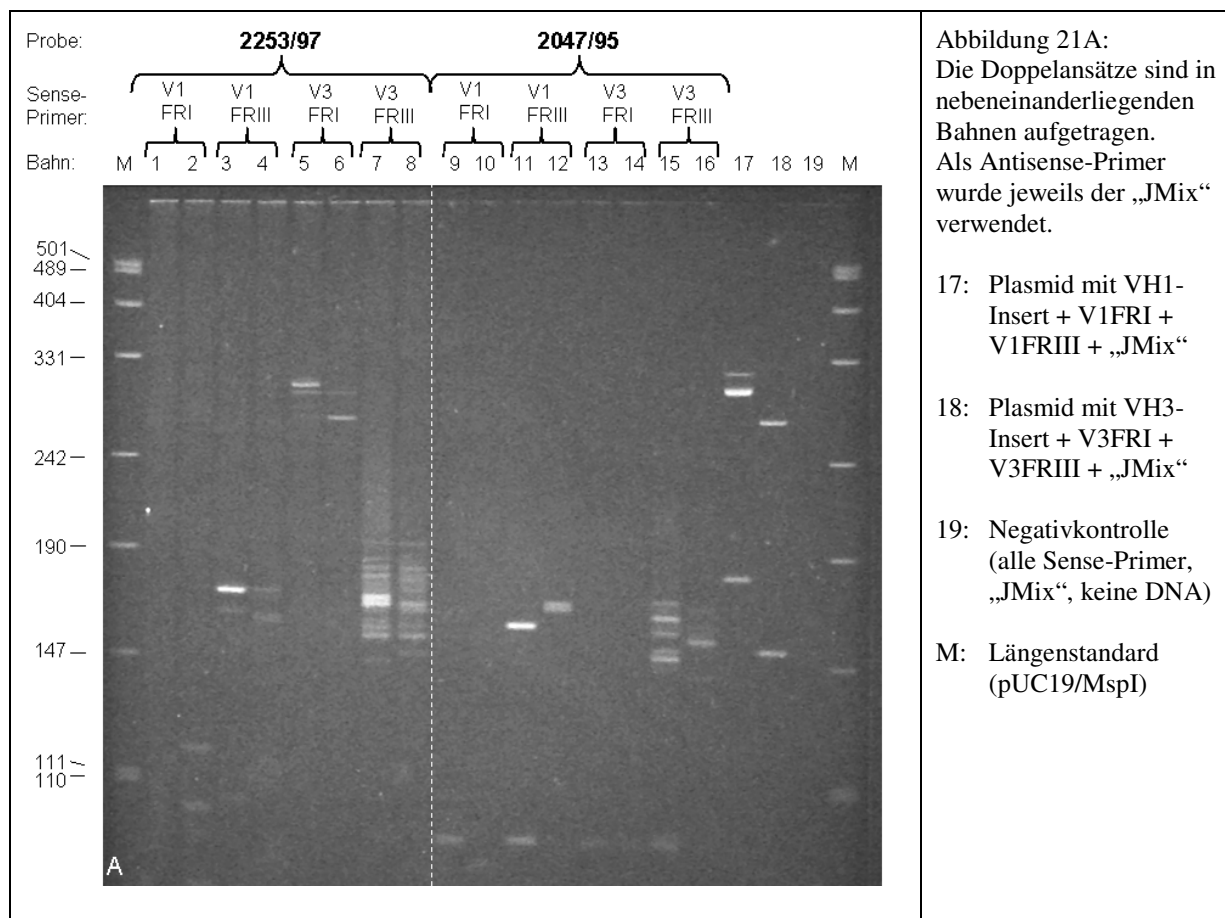
kleinbuchstaben: J-Regionen

ACTTCTTGT: Nonamer

CAATGTG: Heptamer

4.3.5.1.3 Fälle 2253/97 und 2047/95

Abbildung 21: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 2253/97 und 2047/95



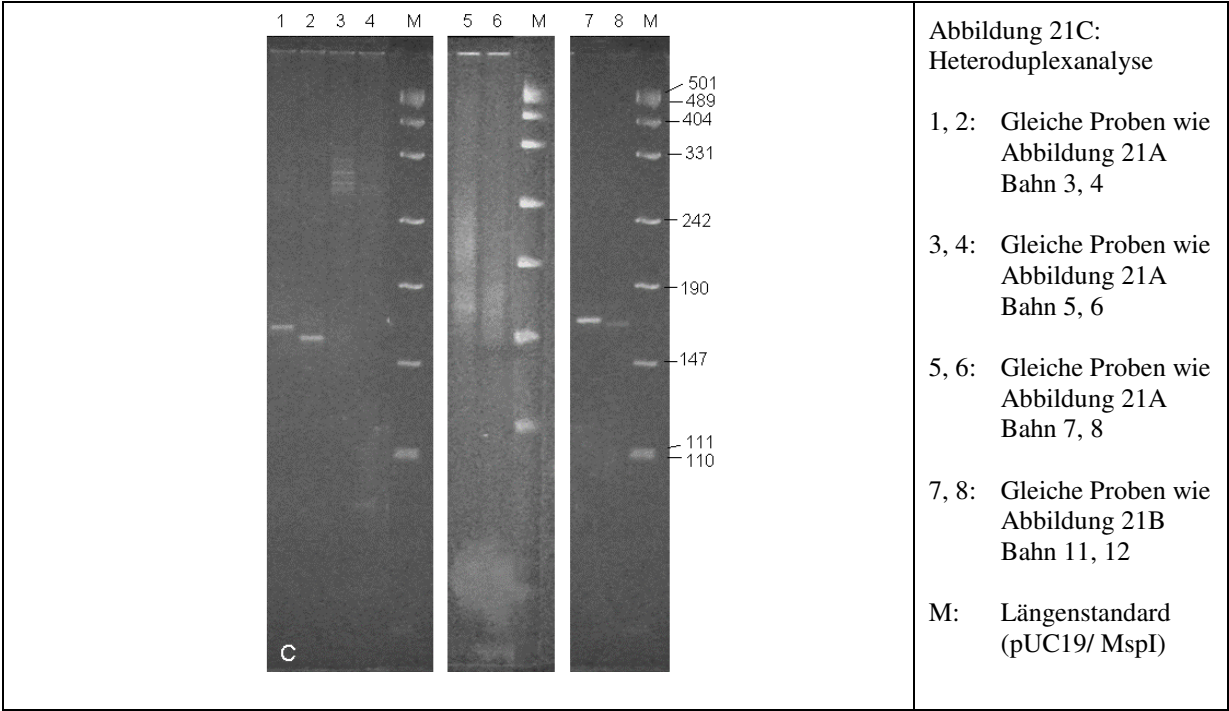


Tabelle 32: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 2253/97

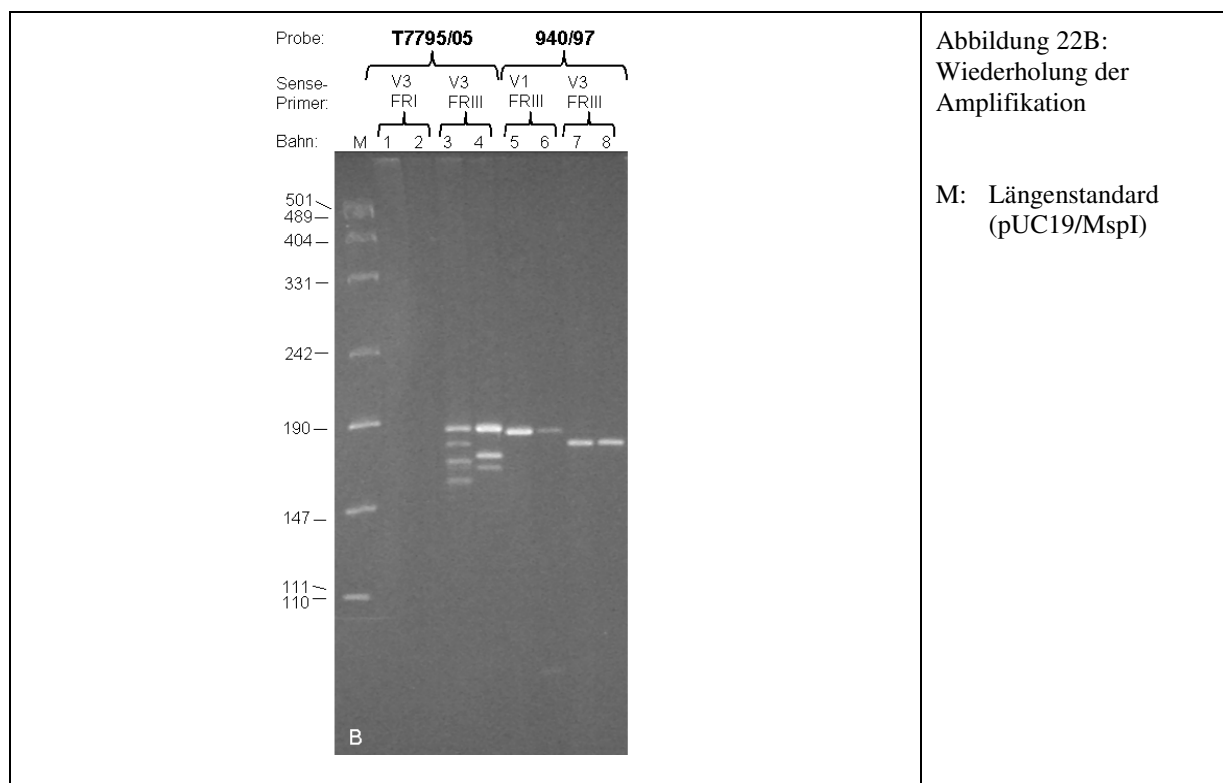
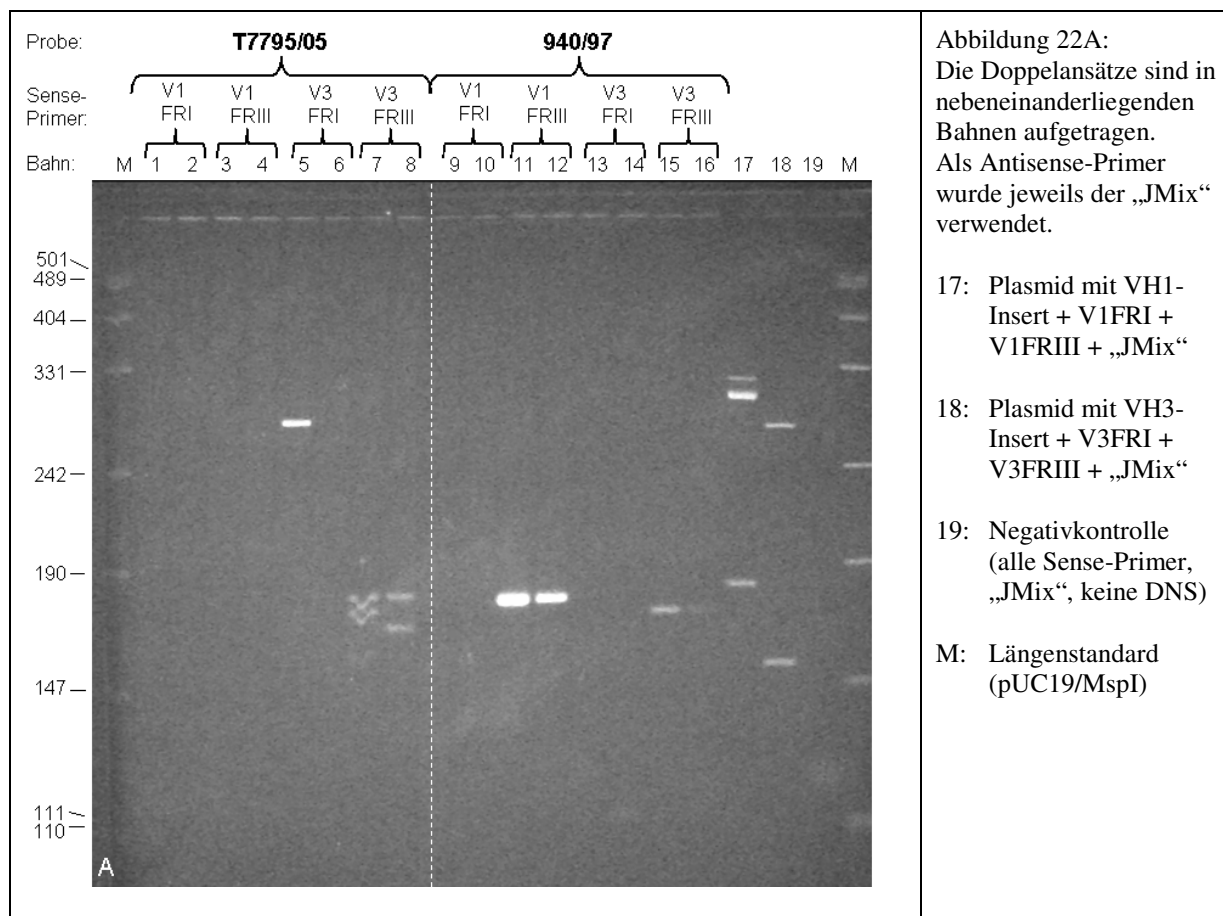
Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 21A, Bahn 1 + 2)	Eine reproduzierbare, ein bis zwei nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 21A, Bahn 3 + 4) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Keine Amplifikation (Abbildung 21B, Bahn 3 + 4) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Zwei Banden unterschiedlicher Größe in den beiden Doppelansätzen (Abbildung 21C, Bahn 1 + 2)	Drei bis vier nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 21A, Bahn 5 + 6) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine nicht reproduzierbare Bande (Abbildung 21B, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 21C, Bahn 3 + 4)	Leitermuster aus 10 bis 12 Banden, die im mittleren Abschnitt eine höhere Fluoreszenz aufweisen (Abbildung 21A, Bahn 7 + 8). <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Schwachtes Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 21B, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 21C, Bahn 5 + 6)

Tabelle 33: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 2047/95

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 21A, Bahn 9 + 10)	Zwei Banden unterschiedlicher Größe in den beiden Reaktionen des Doppelansatzes (Abbildung 21A, Bahn 11 + 12) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine reproduzierbare Bande, eine kleinere Bande in einer der beiden Reaktionen (Abbildung 21B, Bahn 11 + 12) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 21C, Bahn 7 + 8)	Keine Amplifikation. (Abbildung 21A, Bahn 13 + 14)	6 bis 7 nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 21A, Bahn 15 + 16)

4.3.5.1.4 Fälle T7795/05 und 940/97

Abbildung 22: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T7795/05 und 940/97



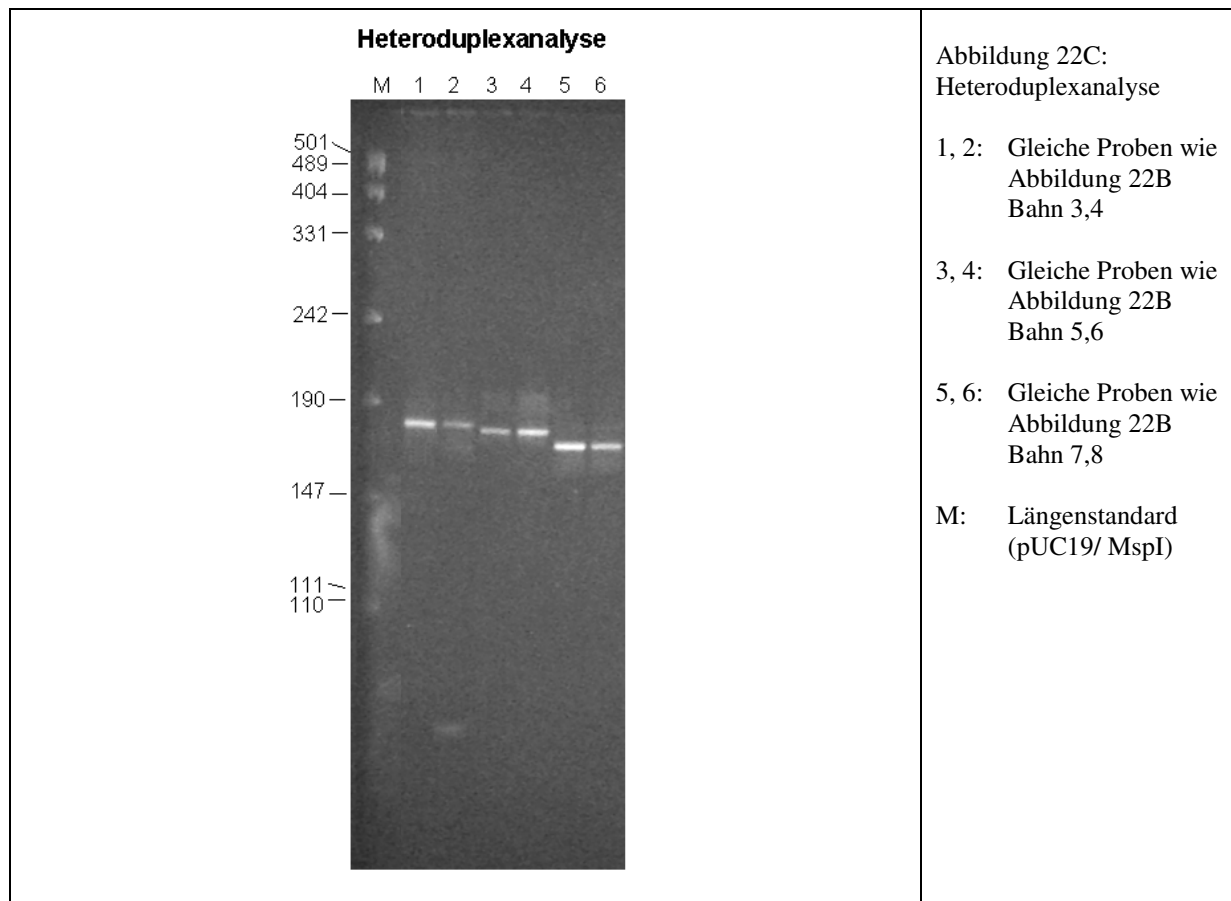


Tabelle 34: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T7795/05

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 22A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 22A, Bahn 3 + 4)	Eine nicht reproduzierbare Bande (Abbildung 22A, Bahn 5) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Keine Amplifikation (Abbildung 22B, Bahn 1 + 2)	Eine reproduzierbare, ein bis zwei nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 22A, Bahn 7 + 8) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine reproduzierbare, drei bis fünf nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 22B, Bahn 3 + 4) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22C, Bahn 1 + 2)

Tabelle 35: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 940/97

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 22A, Bahn 9 + 10)	Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22A, Bahn 11 + 12) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22B, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande bleibt bestehen (Abbildung 22C, Bahn 5 + 8).	Keine Amplifikation (Abbildung 22A, Bahn 13 + 14)	Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22A, Bahn 15 + 16) <u>Wiederholung der Amplifikation:</u> Eine reproduzierbare Bande (Abbildung 22B, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Die reproduzierbare Bande bleibt bestehen (Abbildung 22C, Bahn 7 + 8).

4.3.5.1.5 Fälle T7192/06 und S1003/04

Abbildung 23: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T7192/06 und S1003/04

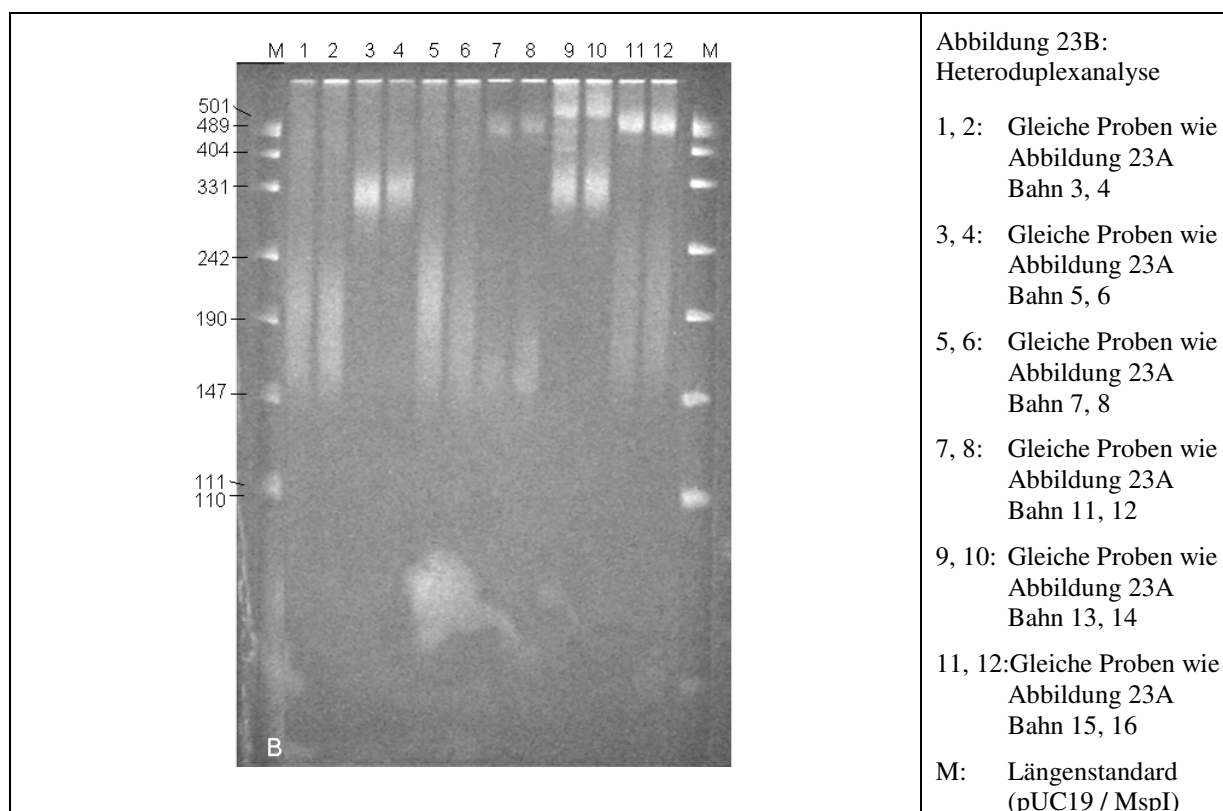
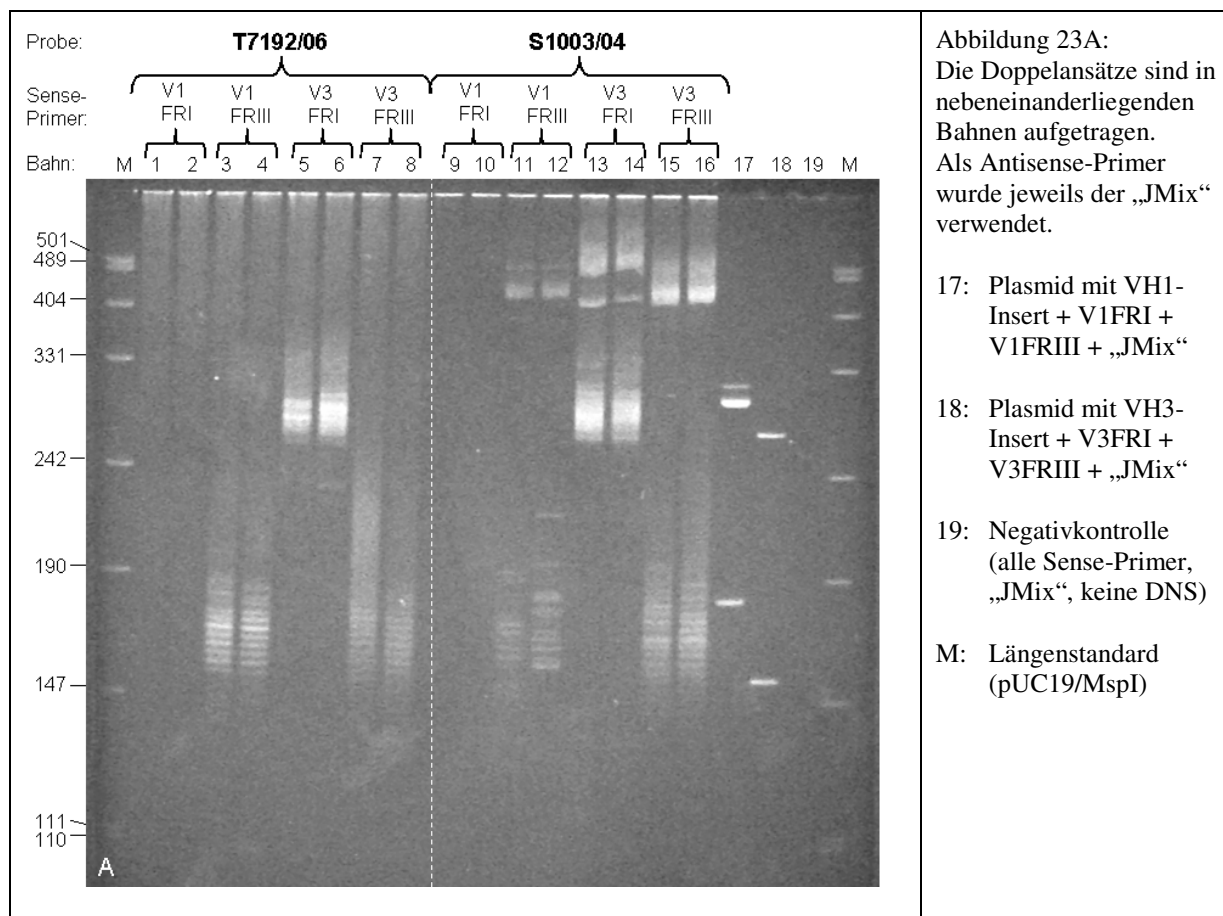


Tabelle 36: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T7192/06

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 23A, Bahn 1 + 2)	Leitermuster aus 10 bis 12 Banden, die im mittleren Abschnitt eine höhere Fluoreszenz aufweisen (Abbildung 23A, Bahn 3 + 4). <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 1 + 2)	Leitermuster mit zusammenfließenden Banden im mittleren Abschnitt (Abbildung 23A, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 3 + 4)	Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 23A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 5 + 6)

Tabelle 37: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S1003/04

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 23A, Bahn 9 + 10)	Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 23A, Bahn 11 + 12) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 7 + 8)	Leitermuster mit zusammenfließenden Banden im mittleren Abschnitt (Abbildung 23A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 9 + 10)	Leitermuster aus 10 bis 20 Banden (Abbildung 23A, Bahn 15 + 16) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 23B, Bahn 11 + 12)

4.3.5.2 Lymphatische Hyperplasien

4.3.5.2.1 Fälle T847/05 und T878/05

Abbildung 24: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T847/05 und T878/05

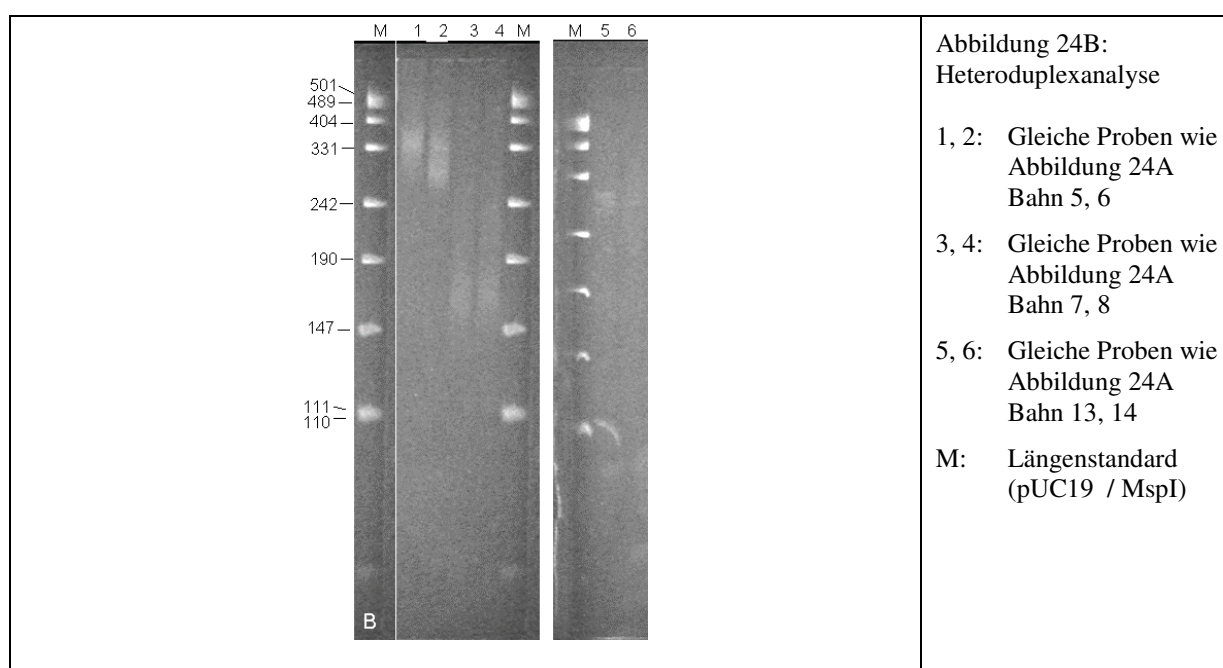
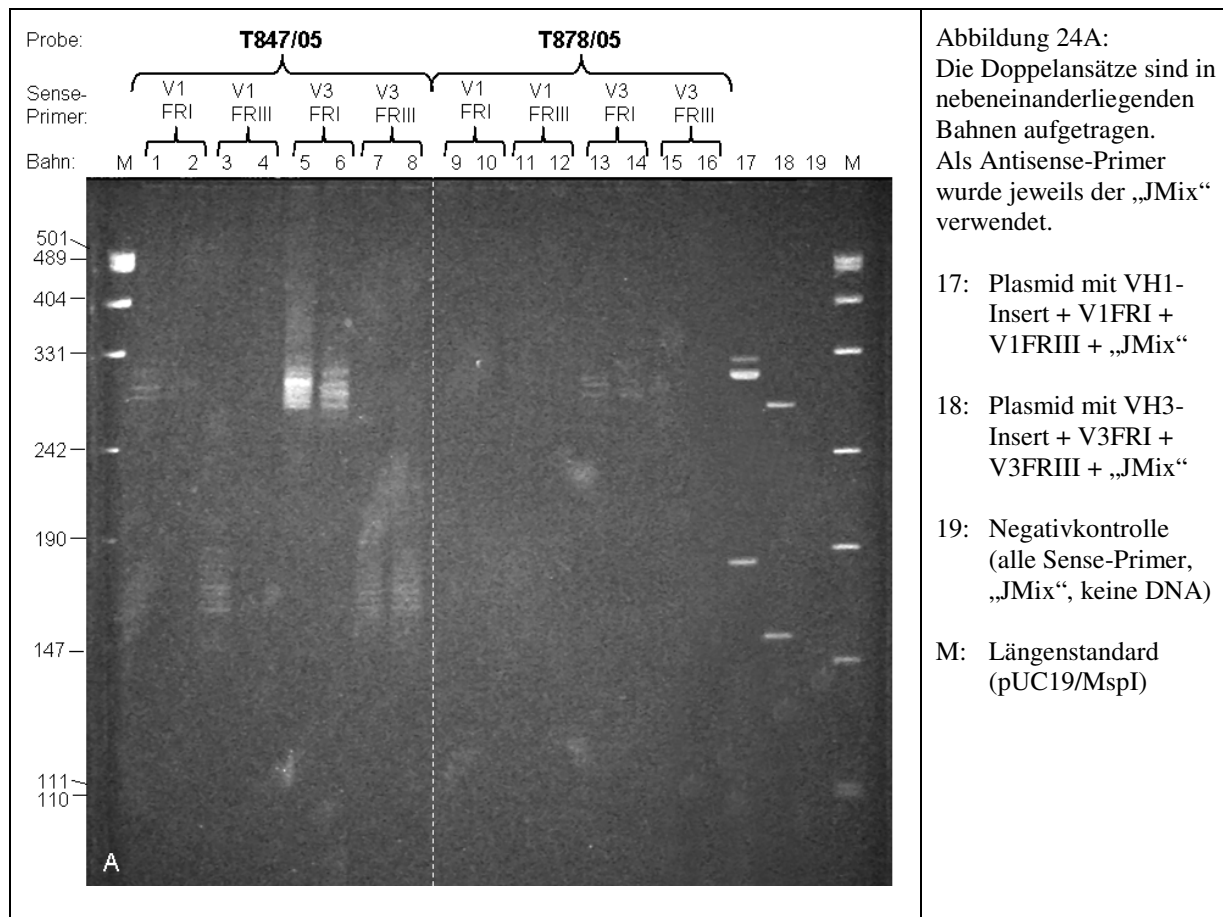


Tabelle 38: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T847/05

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
1 bis 2 nicht reproduzierbare sehr schwache Banden (Abbildung 24A, Bahn 1)	6 bis 8 nicht reproduzierbare Banden (Abbildung 24A, Bahn 3)	Leitermuster mit zusammenfließenden Banden, im mittleren Abschnitt (Abbildung 24A, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 24B, Bahn 1 + 2)	Leitermuster aus 10 bis 14 Banden (Abbildung 24A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 24B, Bahn 3 + 4)

Tabelle 39: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T878/05

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 24A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 24A, Bahn 11 + 12)	2 bis 3 sehr schwache Banden (Abbildung 24A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 24B, Bahn 5 + 6)	Keine Amplifikation. (Abbildung 24A, Bahn 15 + 16)

4.3.5.2.2 Fälle T630/05 und T273/05

Abbildung 25: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T630/05 und T273/05

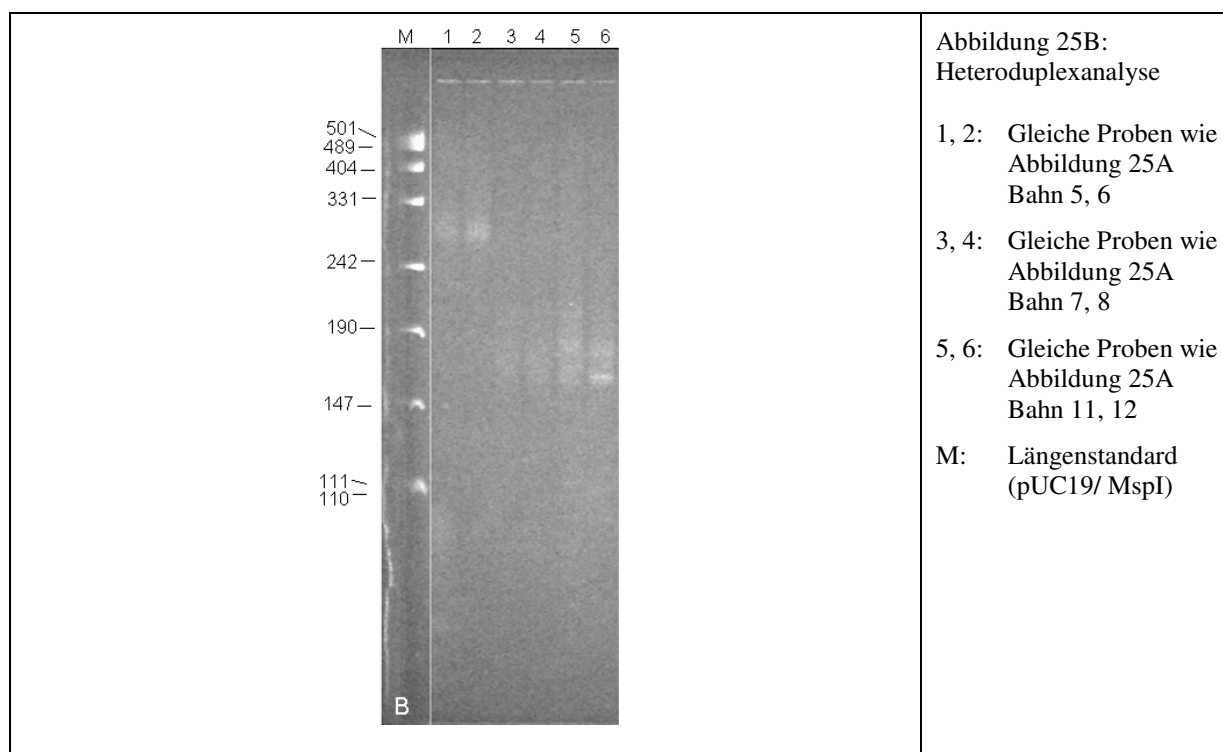
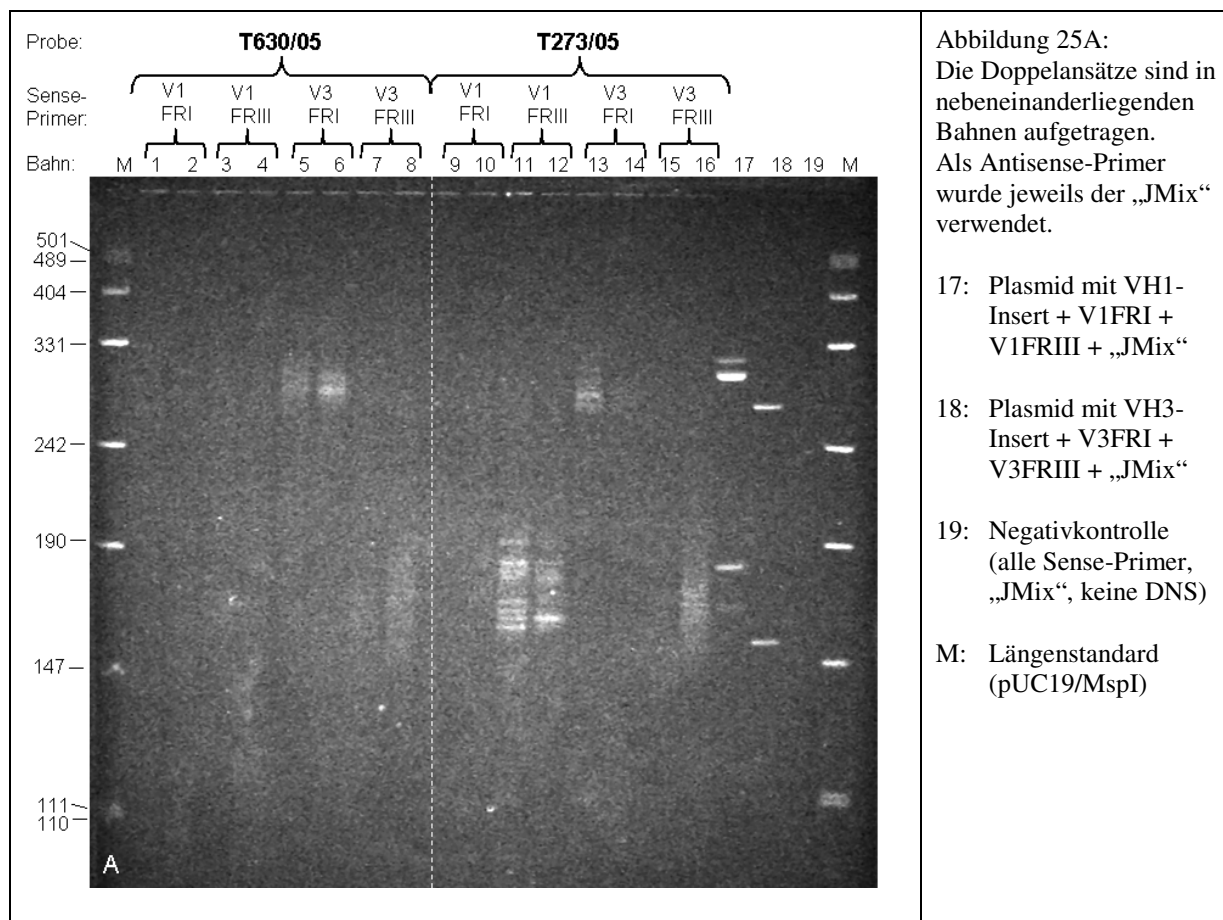


Tabelle 40: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T630/05

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 25A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 25A, Bahn 3 + 4)	6 bis 8 schwache Banden (Abbildung 25A, Bahn 5 + 6) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 25B, Bahn 1 + 2)	Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 25A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 25B, Bahn 3 + 4)

Tabelle 41: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T273/05

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 24A, Bahn 9 + 10)	Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 24A, Bahn 11 + 12) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 24B, Bahn 5 + 6)	5 bis 6 nicht reproduzierbare, schwache Banden (Abbildung 24A, Bahn 13)	Nicht reproduzierbares Leitermuster aus 10 bis 12 Banden (Abbildung 24A, Bahn 16)

4.3.5.2.3 Fälle T3746/05 und T6950/05

Abbildung 26: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T3746/05 und T6950/05

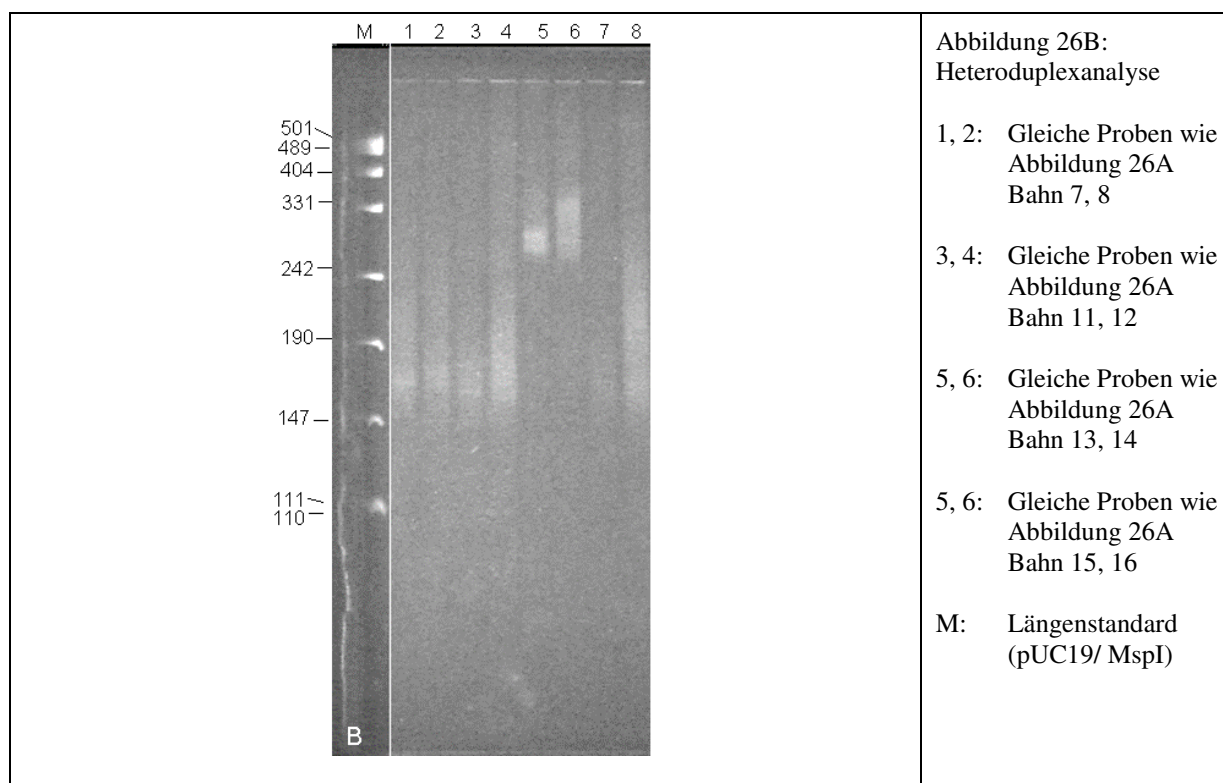
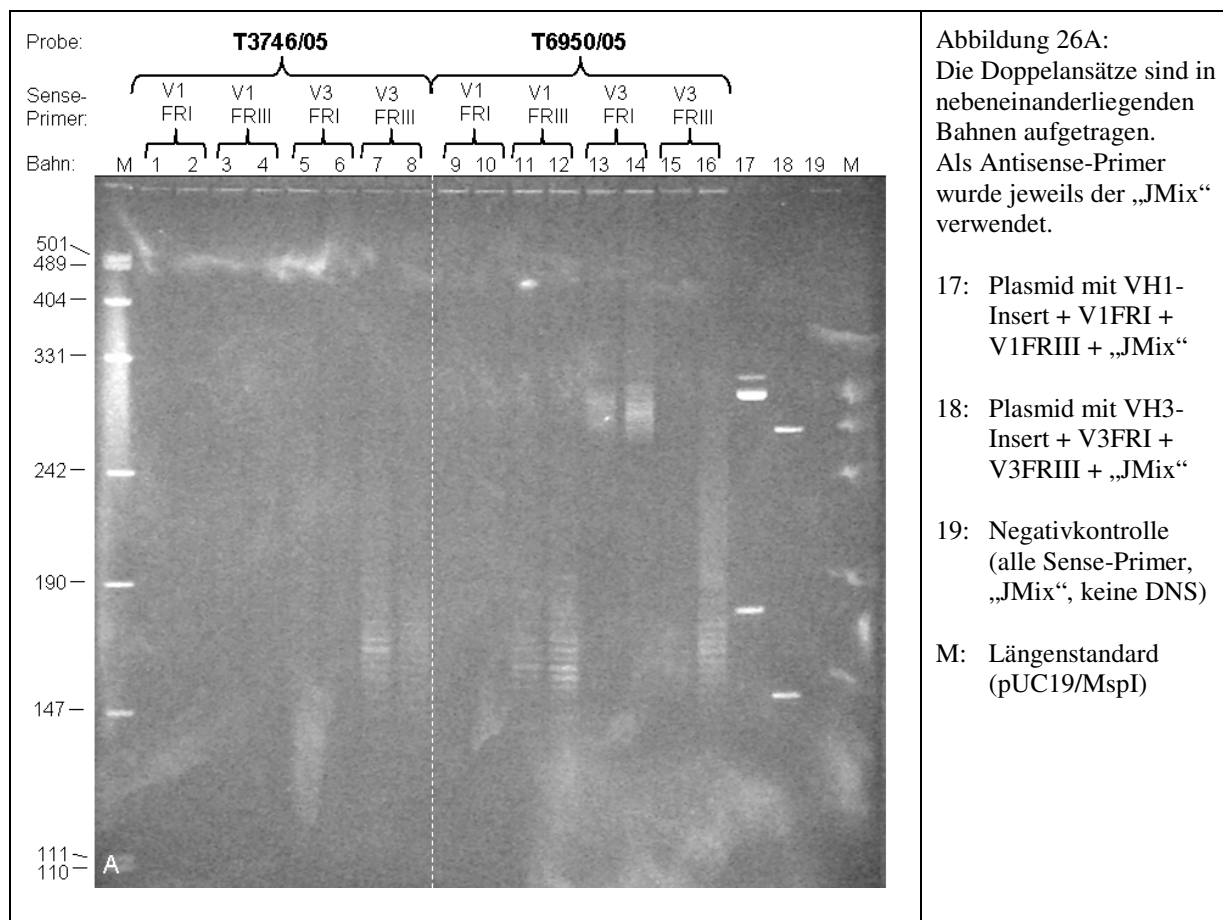


Tabelle 42: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T3746/05

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 26A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 26A, Bahn 3 + 4)	Keine Amplifikation. (Abbildung 26A, Bahn 5 + 6)	5 bis 6 Banden. (Abbildung 26A, Bahn 7 + 8) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 26B, Bahn 1 + 2)

Tabelle 43: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T6950/05

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 26A, Bahn 9 + 10)	Leitermuster aus 6 bis 8 Banden, davon einige reproduzierbar (Abbildung 26A, Bahn 11 + 12) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 26B, Bahn 3 + 4)	Unscharfes Leitermuster (Abbildung 26A, Bahn 13 + 14) <u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 26B, Bahn 5 + 6)	Teilweise reproduzierbares Leitermuster aus 6 bis 8 Banden (Abbildung 26A, Bahn 15 + 16)

4.3.5.2.4 Fälle T7426/06 und S1592/04

Abbildung 27: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle T7426/06 und S1592/04

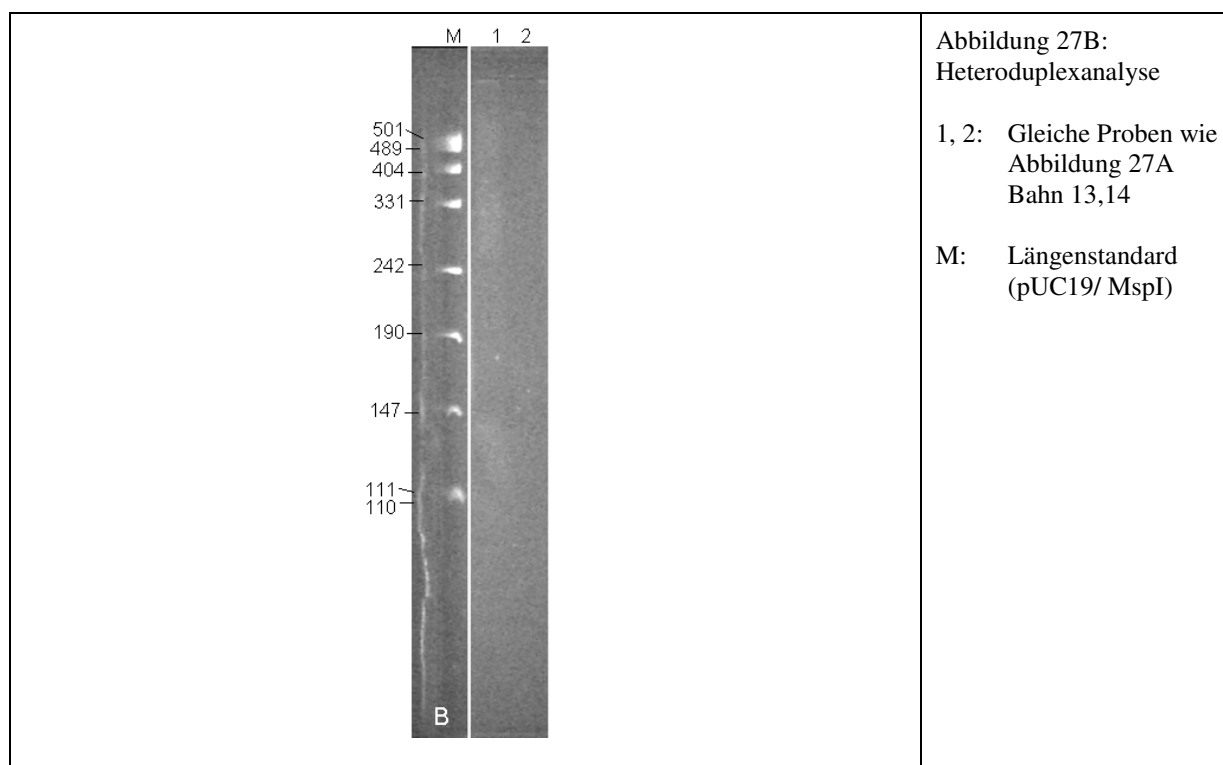
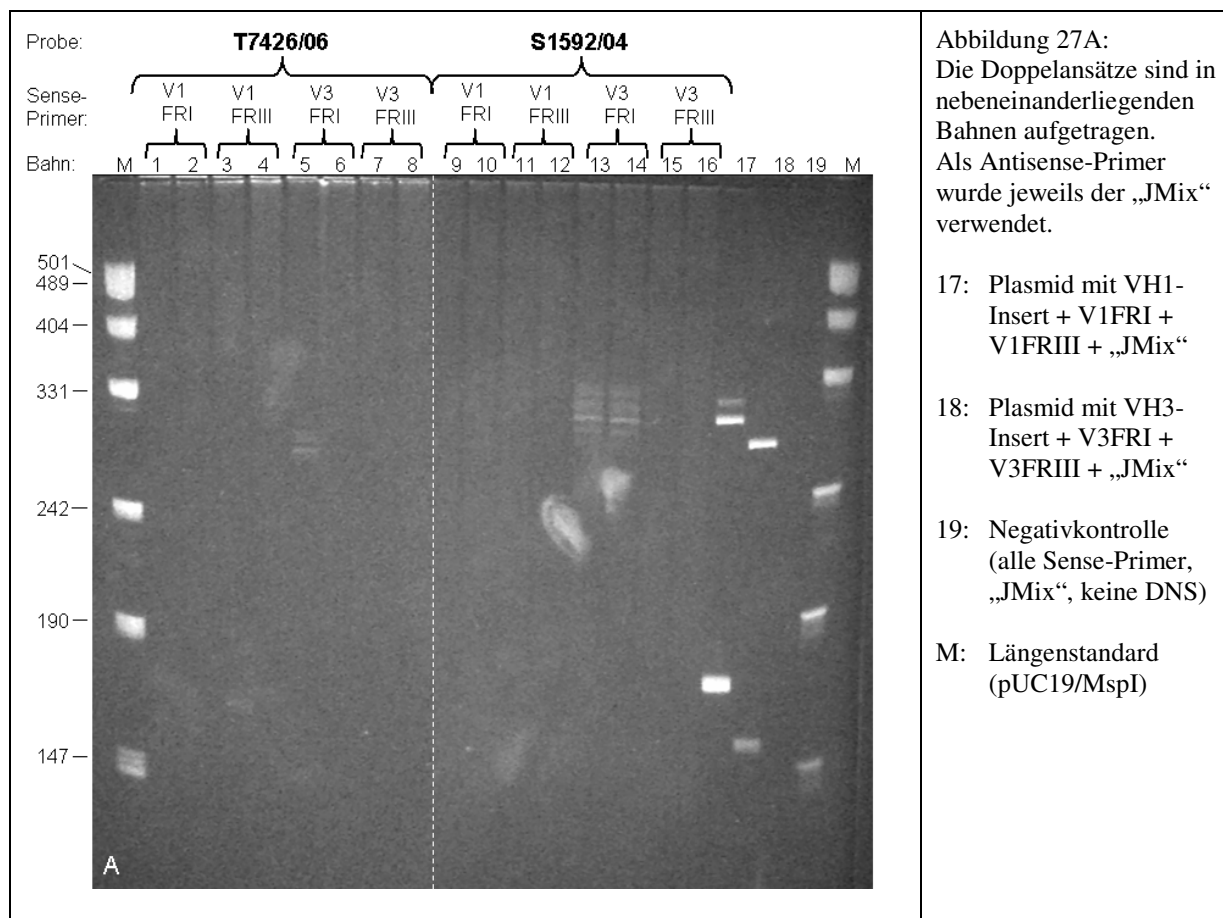


Tabelle 44: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls T7426/06

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 3 + 4)	3 bis 4 nicht reproduzierbare, schwache Banden (Abbildung 27A, Bahn 5 + 6)	Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 7 + 8)

Tabelle 45: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S1592/04

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 11 + 12)	<p>Unscharfes Leitmuster mit erhöhter Fluoreszenz im mittleren Abschnitt (Abbildung 27A, Bahn 13 + 14)</p> <p><u>Heteroduplexanalyse:</u> Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 27B, Bahn 1 + 2)</p>	Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 15 + 16)

4.3.5.2.5 Fälle S345/07 und S348/07

Abbildung 28: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle S345/07 und S348/07

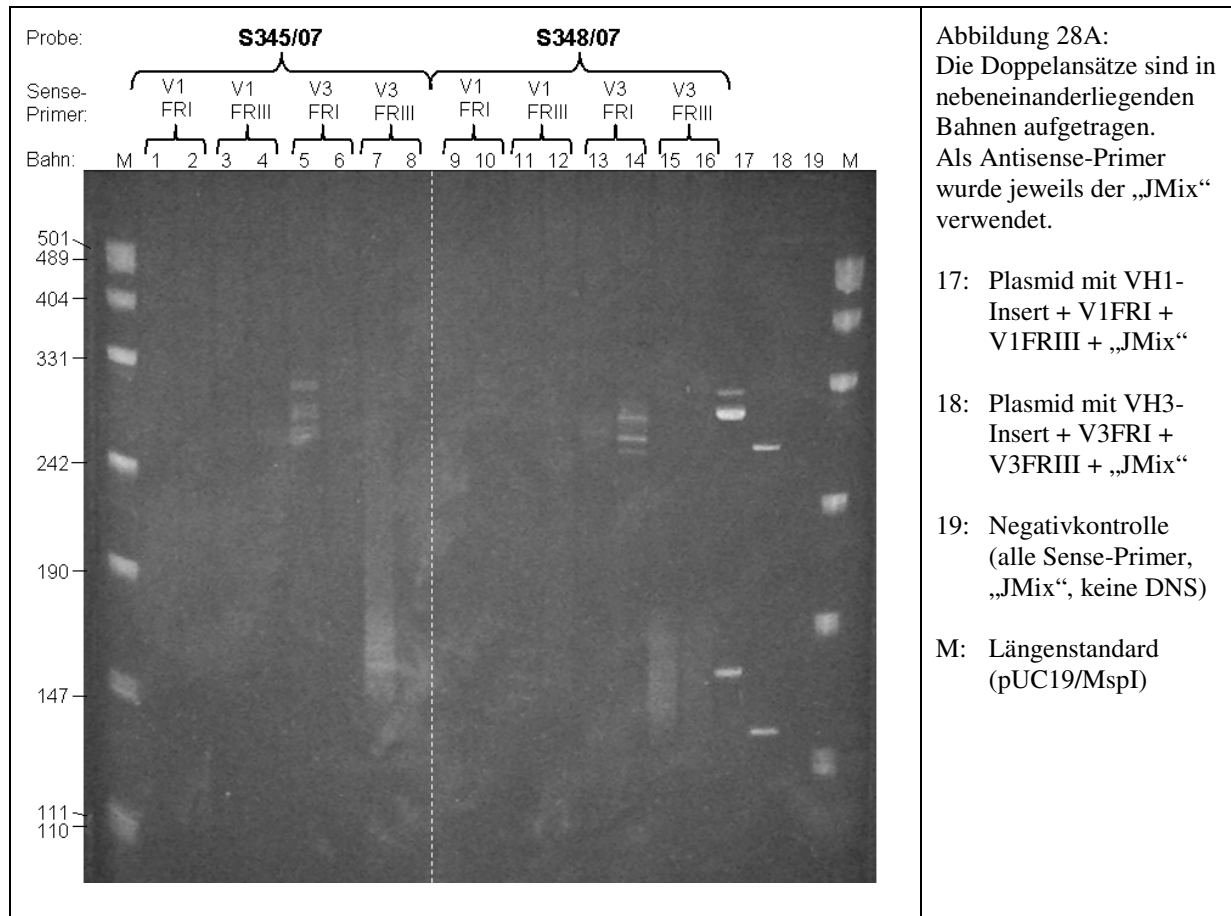


Tabelle 46: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S345/07

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 28A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 28A, Bahn 3 + 4)	6 bis 7 nicht reproduzierbare schwache Banden (Abbildung 28A, Bahn 5)	Unscharfes, nicht reproduzierbares Leiternmuster (Abbildung 28A, Bahn 7 + 8)

Tabelle 47: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S348/07

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 28A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 28A, Bahn 11 + 12)	5 bis 6 nicht reproduzierbare schwache Banden (Abbildung 28A, Bahn 13 + 14)	Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 28A, Bahn 15 + 16)

4.3.5.3 T-Zell-Lymphome

4.3.5.3.1 Fälle 1883/94 und S1017/05

Abbildung 29: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 1883/94 und S1017/05

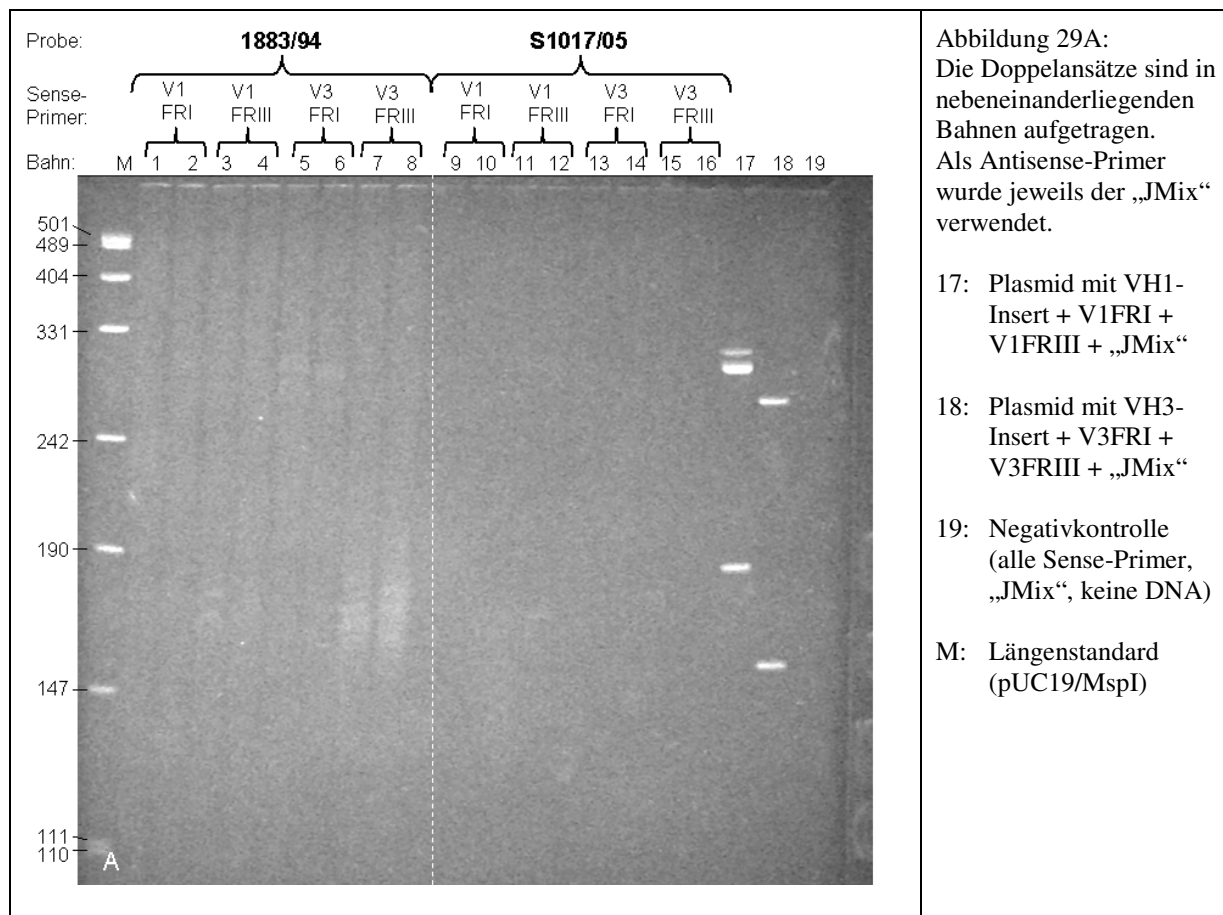


Tabelle 48: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 1883/94

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 3 + 4)	Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 5 + 6)	Unscharfer „Schmier“ (Abbildung 29A, Bahn 7 + 8)

Tabelle 49: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls S1017/05

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 27A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 11 + 12)	Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 13 + 14)	Keine Amplifikation (Abbildung 29A, Bahn 15 + 16)

4.3.5.3.2 Fälle 2155/90 und 280/92

Abbildung 30: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 2155/90 und 280/92

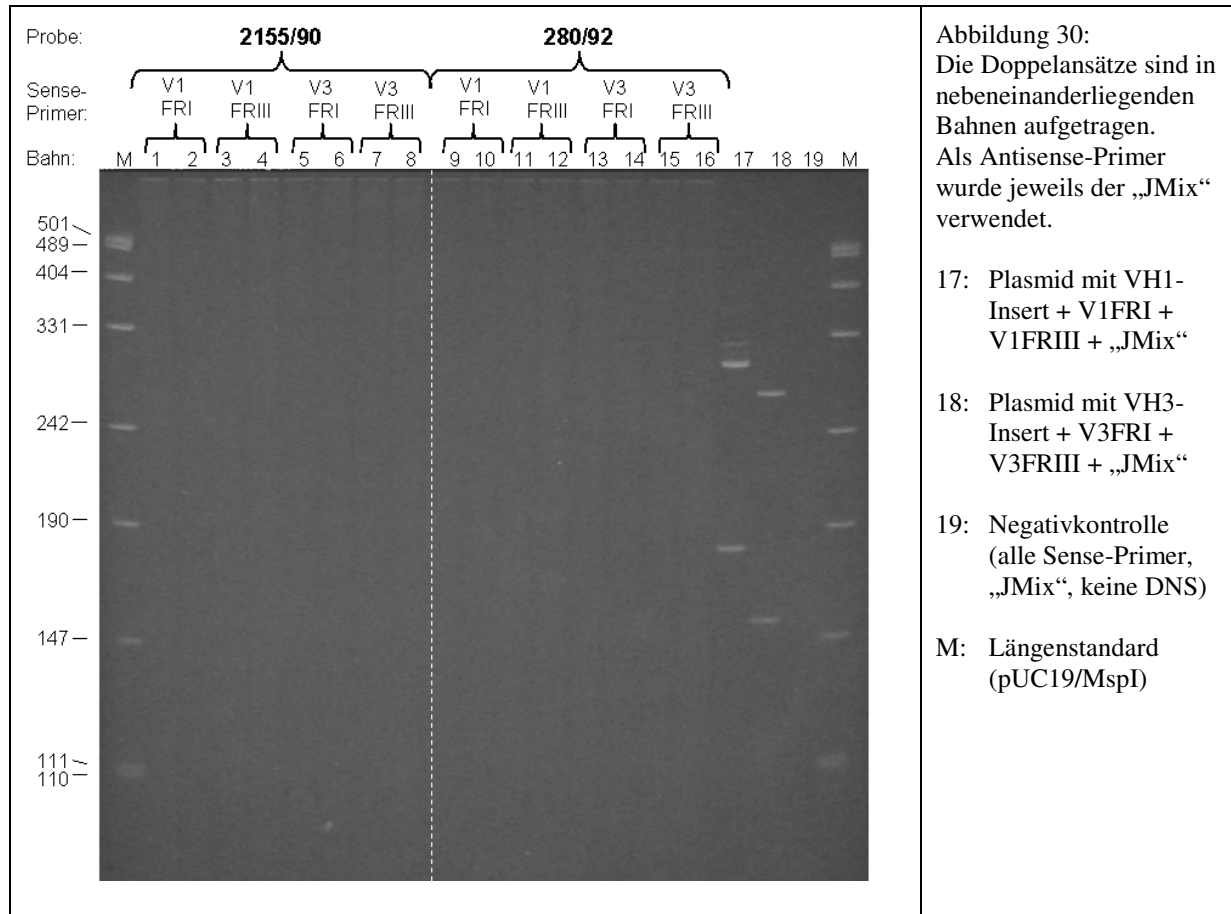


Tabelle 50: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 2155/90

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 3 + 4)	Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 5 + 6)	Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 7 + 8)

Tabelle 51: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 280/92

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 11 + 12)	Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 13 + 14)	Keine Amplifikation (Abbildung 30A, Bahn 15 + 16)

4.3.5.3.3 Fälle 93/93 und 1989/98

Abbildung 31: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 93/93 und 1989/98

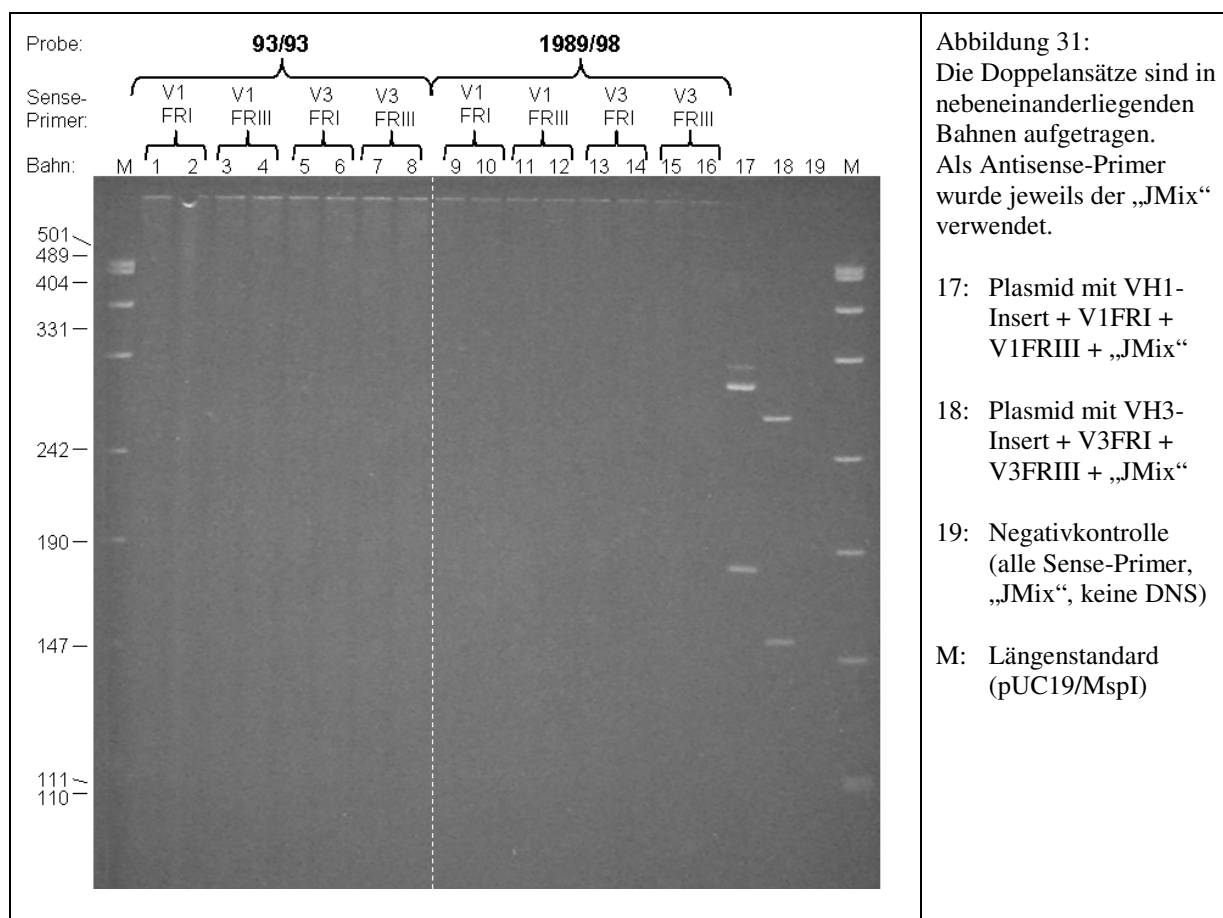


Tabelle 52: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 93/93

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 3 + 4)	Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 5 + 6)	Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 7 + 8)

Tabelle 53: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 1989/98

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 11 + 12)	Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 13 + 14)	Keine Amplifikation (Abbildung 31A, Bahn 15 + 16)

4.3.5.3.4 Fälle 1379/99 und 1945/90

Abbildung 32: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 1379/99 und 1945/90

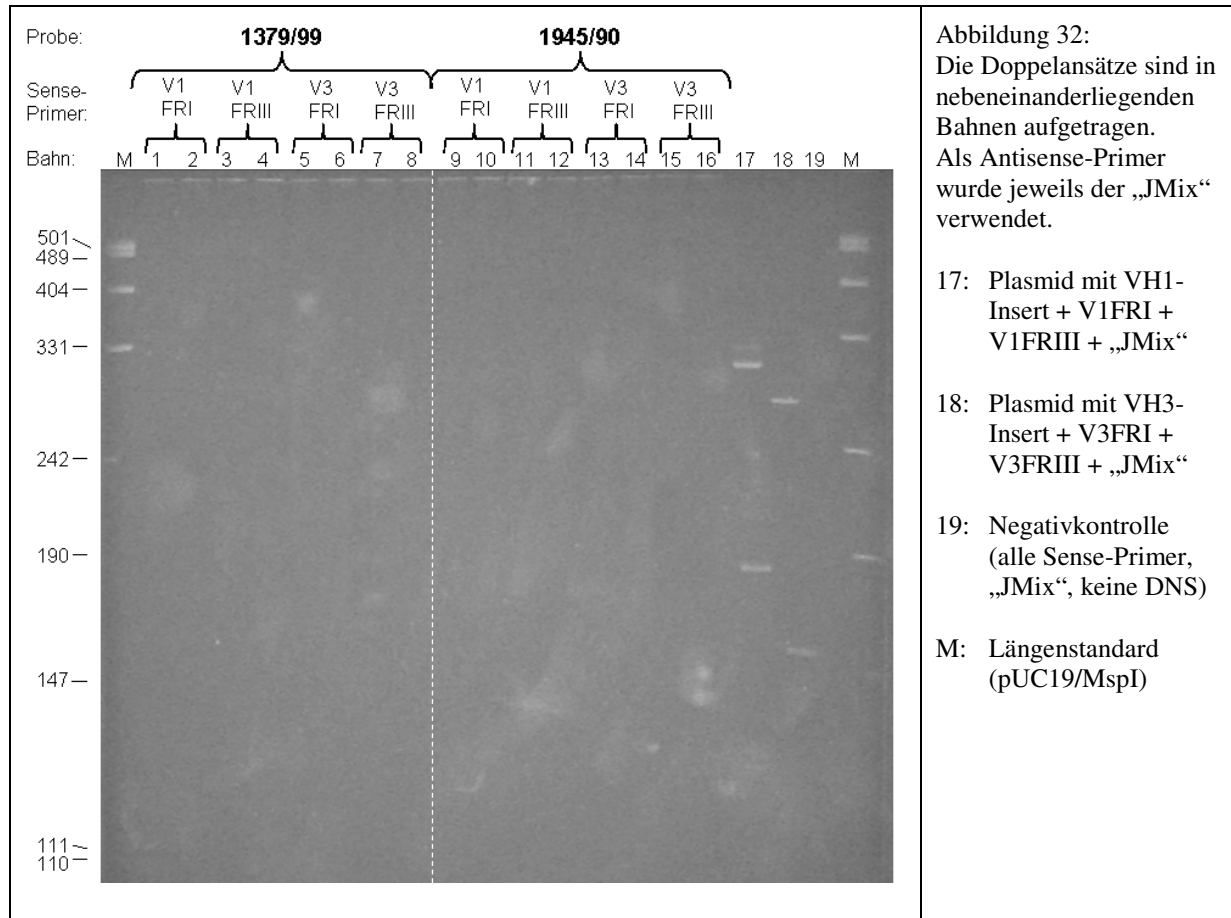


Tabelle 54: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 1379/99

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 3 + 4)	Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 5 + 6)	Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 7 + 8)

Tabelle 55: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 1945/90

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 11 + 12)	Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 13 + 14)	Keine Amplifikation (Abbildung 32A, Bahn 15 + 16)

4.3.5.3.5 Fälle 217/94 und 15/96

Abbildung 33: Ergebnis der Amplifikation der Isolate der Fälle 217/94 und 15/96

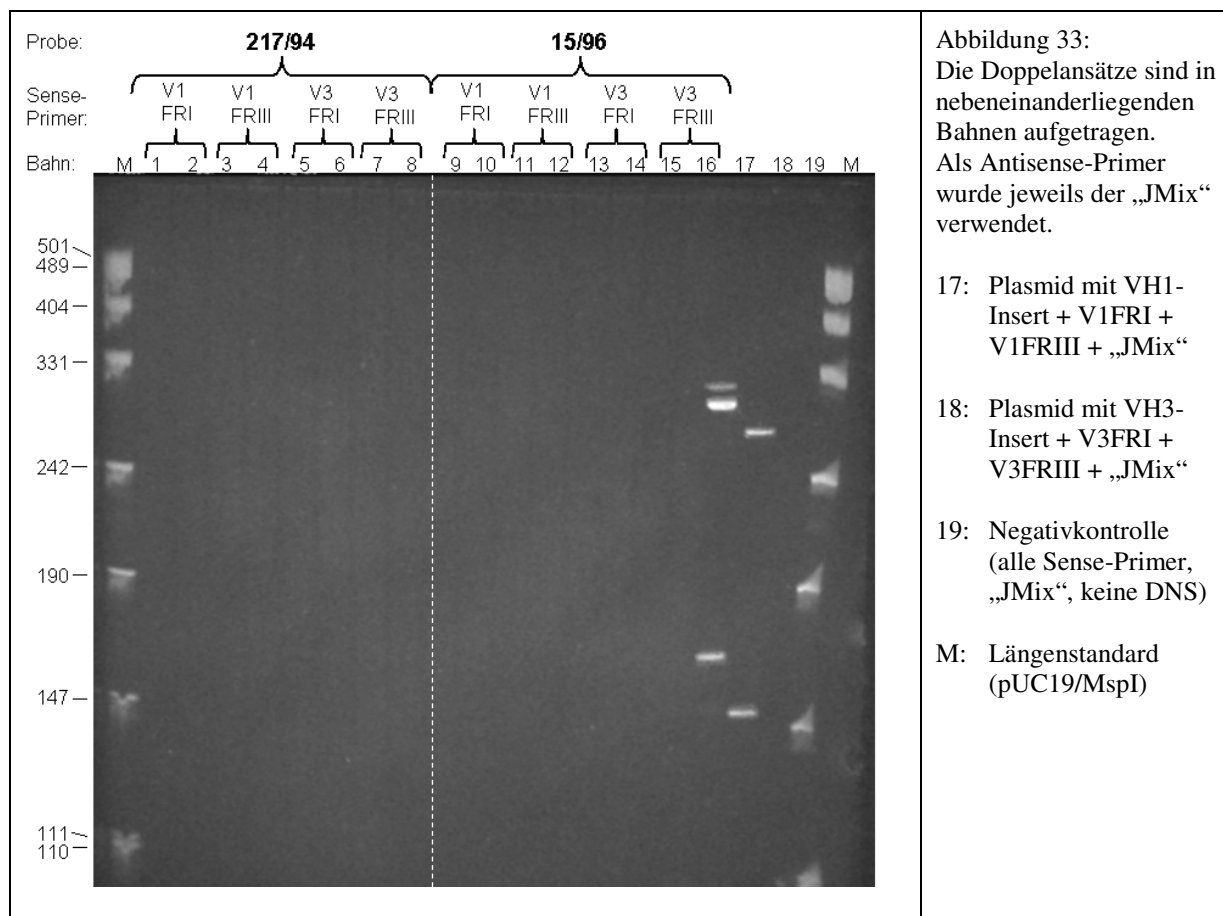


Tabelle 56: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 217/94

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 1 + 2)	Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 3 + 4)	Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 5 + 6)	Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 7 + 8)

Tabelle 57: Beschreibung des Ergebnisses der Amplifikation des Isolats des Falls 15/96

Amplifikation der VH1-Familie		Amplifikation der VH3-Familie	
Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer	Mit FR1-spezifischem Primer	Mit FR3-spezifischem Primer
Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 9 + 10)	Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 11 + 12)	Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 13 + 14)	Keine Amplifikation (Abbildung 33A, Bahn 15 + 16)

4.3.6 Amplifikation der VH1-Positivkontrolle in getrennten Ansätzen

In Abbildung 18 bis Abbildung 33 kann bei der Positivkontrolle der VH1-Familie oberhalb der erwarteten Bande für die Amplifikation mit dem gegen die Framework 1-Region gerichteten Primer eine zusätzliche schwache Bande beobachtet werden (s. z.B. Abbildung 18A, Bahn 17).

Zur Überprüfung inwieweit Interaktionen der Amplifikate miteinander eine Rolle bei der Entstehung dieser zusätzlichen Bande spielen, wurde das Plasmid mit dem Insert aus der VH1-Familie mit beiden Sense-Primern zusammen und den jeweiligen Sense-Primern im Einzelansatz unter den in Absatz 3.9.2.1 beschriebenen Bedingungen amplifiziert.

Abbildung 34: Ergebnis der Amplifikation der Positivkontrolle der VH1-Familie

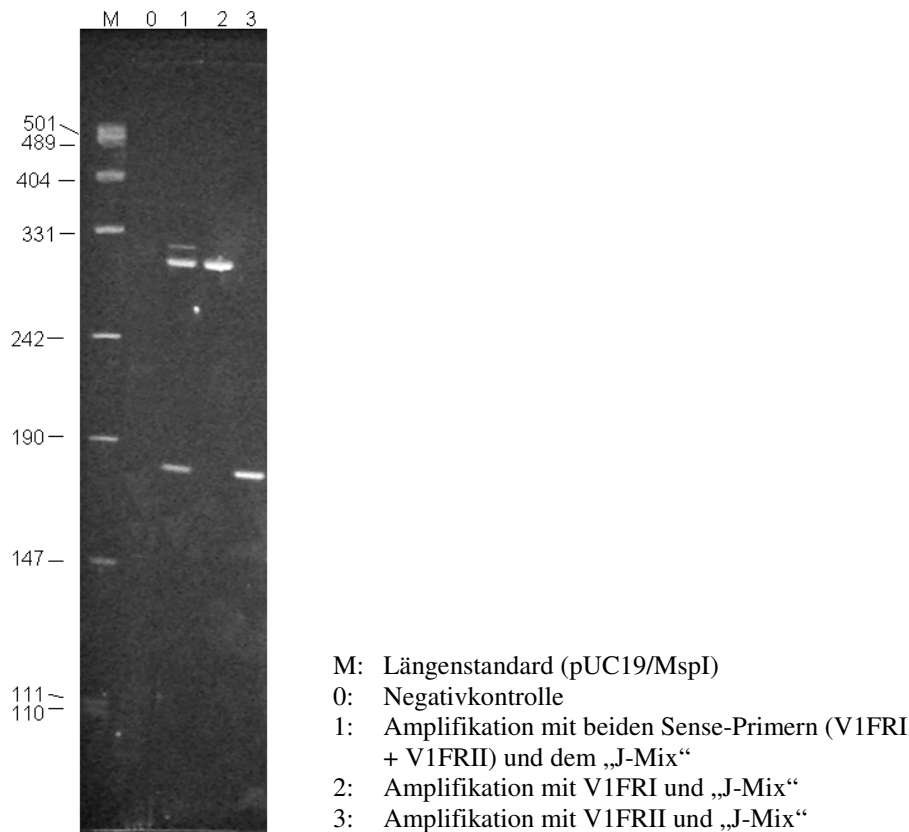


Abbildung 34 zeigt, dass die zusätzliche Bande bei Amplifikation der Primer im Einzelansatz nicht mehr vorhanden ist.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, für die Katze ein PCR-gestütztes diagnostisches System zur Abgrenzung neoplastischer B-Zell Populationen von reaktiven lymphatischen Geweben zu entwickeln. Da das Genom der Katze noch nicht vollständig entschlüsselt und charakterisiert ist, konnte für die Entwicklung der Primer für das diagnostische System nur bedingt auf bestehende Sequenzen zurückgegriffen werden. Die optimale Grundlage für die Entwicklung eines bestmöglichen Systems wäre die genomische Charakterisierung der entsprechenden Gene im Vergleich mit Expressionsanalysen der einzelnen Varianten. Da dies aber die Grenzen der vorliegenden Arbeit weit übersteigen würde, mussten als praktikablere Lösung möglichst viele exprimierte Gene analysiert und auf Grundlage dieser Sequenzen die diagnostischen Primer erstellt werden.

5.1 Analyse der schweren Kette des felines Immunglobulins

Basis für die Analyse der variablen Region der schweren Kette des felines Immunglobulins war die veröffentlichte Sequenz der konstanten Region der schweren Kette des felines IgM (Cho et al., 1998). Bei Analysen der Gene der variablen Region des felines TCR- γ zeigte sich, dass die in derselben Arbeit veröffentlichte Sequenz der konstanten Region des felines TCR- γ nicht ohne weiteres nachvollziehbar war (Weiss, 2007). Die Überprüfung der Sequenz der konstanten Region der schweren Kette des felines IgM am eigenen biologischen Material ergab jedoch eine 99%ige Übereinstimmung mit den veröffentlichten Sequenzen, so dass diese daraufhin als weitere Basis für die Analyse verwendet werden konnten.

5.1.1 Analyse der Gene der schweren Kette mit der SMARTTM RACE-Technik

Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass cDNA hergestellt werden kann, die der vollen Länge der RNS-Matrize entspricht. Dies ist für die Suche nach unbekannten Gensequenzen vorteilhaft. Da das „SMARTTM RACE Amplification Kit“ die MarathonTM cDNATechnologie (Chenchik et al., 1995) mit der SMART-Methode (Switch Mechanism At 5' End of RNA Transcript) verbindet, ist es möglich, hochqualitative cDNA aus geringen Mengen Gesamt-RNS inklusive der 5' und 3' Enden (Rapid Amplification of cDNA Ends = RACE) zu amplifizieren.

Die SMART[™] RACE-Technik zeigte zunächst sehr gute Ergebnisse, um die weiter in 5'-Ende gelegenen Abschnitte zu amplifizieren. Durch die Erweiterung der bekannten Sequenz der schweren Kette und die daraus resultierenden Primer gelang die Analyse des Anfangsteils der variablen Region. Die Methode wurde nach weiteren Versuchen aufgegeben, weil lediglich ein Klon mit genügend großem Insert erzeugt werden konnte. Dieses Problem kann im Ausgangsmaterial begründet sein. RNS unterliegt durch die Omnipräsenz von RNasen sehr schnell der enzymatischen Spaltung. Dies führt dazu, dass im Ausgangsmaterial auch unvollständige, kleine mRNA-Moleküle vorliegen. Gelangt bei der SMART[™] RACE-Technik die Polymerase an das 5'-Ende der mRNA, entfaltet sie ihre terminale Transferaseaktivität unabhängig davon, ob dieses Ende durch Spaltung entstanden ist oder das ursprüngliche Ende der mRNA darstellt.

Dies bedeutet, dass als Grundlage der folgenden Amplifikation ein Gemisch aus größeren und kleineren cDNA-Fragmenten vorliegt, die alle die Sequenz des SMART II[™] Oligonukleotids beinhalten und amplifiziert werden können. Dies konnte beispielsweise an der Sequenz des Klons R3.1 (vgl. Abbildung 8) gezeigt werden, der eine unvollständige Version der variablen Region der schweren Kette mit integriertem SMART II[™] Oligonukleotid am 5'-Ende enthält. Sowohl bei der Amplifikation in der PCR als auch bei der Transformation im Zuge der Klonierung werden kleinere DNS-Moleküle bevorzugt, was die geringe Zahl an ausreichend großen Inserts in den erzeugten Klonen erklären könnte.

5.1.2 Analyse des NCBI Trace Archivs

Das NCBI Trace Archiv ist eine Datenbank mit unsortierten Ergebnissen aus Genom-Projekten verschiedener Spezies. Zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit waren für die Spezies *Felis catus* 10.301.275 Einträge gespeichert. Mit dem BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool)-Programm ist es möglich, die Einträge des Trace Archivs gezielt nach bestimmten Sequenzen zu durchsuchen. Aufgrund der hohen Zahl von Einträgen, die für die Katze in dieser Datenbank vorhanden sind, kann angenommen werden, dass ein nicht unbeträchtlicher Teil des Genoms der Katze in Form von unsortierten Rohdaten vorliegt. Die Vollständigkeit bleibt jedoch ungewiss, so dass die Ergebnisse der Analyse nur als Anhaltspunkt für die tatsächliche Situation in vivo dienen können.

Grundlage der Analyse waren die Ergebnisse, dass die konstanten Bereiche des felines B-Zell-Rezeptors zu 60-80% mit den humanen Genen übereinstimmen (Cho et al., 1998). Darauf aufbauend entstand die Hypothese, dass eine ähnlich große Übereinstimmung mit den konservierten Bereichen der variablen Region bestehen könne oder zumindest eine im

Detektionsbereich des BLAST[®]-Programms liegende. Mit den Sequenzen der Mitglieder der humanen VH-Familien als Suchsequenzen konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Suche im NCBI Trace Archiv Sequenzen zweier der humanen VH-Familien homologer feline VH-Familien vorlagen (VH1 und VH3). Hierbei war auffällig, dass die Mehrheit der gefundenen Traces homolog zu humanen VH3-Familie war, wohingegen weniger Traces eine Homologie zur humanen VH1-Familie zeigte. Betrachtet man die Häufigkeit der Mitglieder der humanen VH-Familien, so zeigt sich, dass hier die VH3-Familie mit 52 Genen die zahlenmäßig stärkste Familie bildet, gefolgt von der VH1-Familie mit 17 Mitgliedern (Lefranc, 2001). Die Ähnlichkeit in der Häufigkeitsverteilung der VH-Familien zwischen Mensch und gefundenen Traces der Katze kann ein Hinweis auf eine mögliche Ähnlichkeit der beiden Spezies in Bezug auf die Häufigkeit der Gene der einzelnen Familien auf genomischer Ebene sein. Allerdings gilt dies nur unter dem Vorbehalt der Ungewissheit über die Vollständigkeit des Katzensgenoms in den Traces des NCBI-Archivs und der Möglichkeit der Überlappung und Mehrfacherfassung bestimmter Abschnitte des Genoms in verschiedenen Traces.

5.1.3 Leader-PCR

Mit der Identifizierung der Leadersequenzen in den Traces konnten Primer entwickelt werden, die spezifisch für die einzelnen Familien waren und gleichzeitig in einem unmittelbar vor den gesuchten Genen der variablen Region gelegenen Abschnitt binden sollten. Mit Hilfe dieser Primer konnten Klone mit Inserts erzeugt werden, die die vollständige Sequenz der Gene des variablen Anteils der schweren Kette enthielten. Gegen die Leader-Region gerichtete Primer wurden auch in der Humanmedizin erfolgreich für die Analyse des Repertoire der VH-Familien eingesetzt (Campbell et al., 1992). Ein Einsatz dieser Primer zum Nachweis von Monoklonalität von Lymphomen ist möglich und wurde auch in der Humanmedizin an genomischer DNS, isoliert aus B-Zell-Lymphom-Zelllinien, angewandt (Inghirami et al., 1993). Der Einsatz von weiter in Richtung 3'-Ende der DNS gelegenen Primern hat jedoch den Vorteil, dass die erwarteten Amplifikate kleiner sind. Dies ist in zweierlei Hinsicht wichtig. Einerseits müssen für größere Amplifikate größere Ausgangsmoleküle vorliegen, d.h. die DNS-Qualität muss besser sein. Auf der anderen Seite ist die Geschwindigkeit, mit der sich DNS-Moleküle bei der Elektrophorese vorwärts bewegen umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Basenpaaranzahl (Helling et al., 1974). Daher ist die Trennungsschäfe bei gegebener Elektrophoresezeit zwischen zwei DNS-Molekülen abhängig von ihrem Größenverhältnis zueinander. Das

bedeutet, dass sich geringe Längenunterschiede bei der Trennung kleinerer Fragmente schneller bemerkbar machen, als bei großen Fragmenten.

5.1.4 Analyse mit der CapFishingTM Technik

Die neun mit der CapFishingTM-Methode gewonnenen Inserts wurden alle der VH3-Familie zugeordnet. Mitglieder der VH1-Familie konnten mit dieser Methode nicht detektiert werden. Die CapFishingTM-Methode war bei der Amplifikation der V-Region ausgehend von der bekannten C-Region allerdings erfolgreicher als die SMARTTM RACE-Technik.

5.2 Diagnostikprimer

Der erste Schritt im Zuge des Genarrangements der schweren Kette ist die Kombination eines D-Segments mit einem J-Segment. Daher wäre die sensibelste Methode für die Detektion von Immunglobulinrearrangements für die molekulare Diagnostik auch unreifer B-Zell-Neoplasien eine Bindung von Primern im Bereich der D-Region (Diaz-Cano, 1996). Allerdings bildet dieser Bereich einen Großteil der dritten hypervariablen Region. Durch die Variabilität ist diese Region für die Bindung von Primern, die möglichst viele unterschiedliche IgH-Gensequenzen erfassen sollen, ungeeignet. Geeigneter für solche Primer sind die Framework-Regionen. Klonalitätsanalysen im humanmedizinischen Bereich, aber auch Arbeiten über die Amplifikation der Immunglobulingene des Hundes zur molekularen Diagnostik zielen auf diese Bereiche (Burnett et al., 2003; Segal et al., 1994a; Segal et al., 1994b).

Die auf Grundlage der gewonnenen Sequenzen der schweren Kette des felines Immunglobulins entwickelten Sense-Primer wurden so gewählt, dass sie für jede Familie in Bereiche großer Homologie zwischen den einzelnen Sequenzen binden. Für jede Familie wurden zwei familienspezifische Primer als Sense-Primer gewählt. Einer der Primer wurde für die Bindung im Bereich der ersten Framework Region, der zweite für die Bindung im Bereich der dritten Framework Region gewählt. Dies entspricht dem in der Literatur als gut zur Aufspürung von Immunglobulin-Rearrangements erachtetem Vorgehen (Deane und Norton, 1990, 1991; Diaz-Cano, 1996; Inghirami et al., 1993). Der Grund liegt vor allem darin, dass mit dem Einsatz von zwei verschiedenen Sense-Primern pro Familie das Risiko verringert werden kann, dass eine Probe aufgrund der fehlenden Bindungsfähigkeit eines Primers nicht amplifiziert wird.

Die Antisense-Primer wurden so gewählt, dass sie einerseits möglichst alle bei der Analyse der Gene des feline Immunglobulins gefundenen Sequenzen erfassen, gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass für den Fall einer Bindung von mehr als einem Primer die Position der einzelnen Primer in der J-Region exakt übereinstimmt. Dadurch konnte eine Anwendung der Primer als Primer-Mischung in der Multiplex-Reaktion gewährleistet werden und die Anzahl der notwendigen PCR-Ansätze pro Probe von 24 auf 8 gesenkt werden.

5.2.1.1 Vergleich mit dem bestehenden Diagnostiksystem

In der von Werner et al. (2005) veröffentlichte Studie zur molekularen Klonalitätsdiagnostik von B-Zell-Lymphomen bei der Katze wurden 24 mit der SMARTTM RACE-Technik gewonnene Sequenzen der schweren Kette des feline Immunglobulins analysiert. Die Autoren fanden bei allen 24 Sequenzen eine große Homologie im Bereich der Framework-Regionen und entwickelten auf der Basis dieser Sequenzen zwei Sense-Primer im Bereich der Framework-Region 2 und der Framework-Region 3 (FR2: 5'-CCAGGCTCCAGGGAAGGG-3' und FR3: 5'-TCCAGAGACAACGCCAAGAAC-3').

Vergleicht man die in der Studie angegebenen Proteinsequenzen mit der Übersetzung der in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen, so wird deutlich, dass sich die 24 von Werner et al. (2005) gefundenen Sequenzen der VH3-Familie zuordnen lassen. Abbildung 35 zeigt den Vergleich zwischen der Übersetzung des Klons TR-FIG-17 von Werner et al. (2005) mit den Proteinsequenzen der Klone LV3.1.13 (VH3) und LV1.1.33 (VH1).

Abbildung 35: Vergleich der Proteinsequenz von Werner et al. (2005) mit der Übersetzung von eigenen VH1 und VH3-Sequenzen

TR-FIG-17	1	MEFVLGWVFLVTLLKGVQCDVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVASGFTFSSYTMNWVRQAP	60
LV3.1.13	1	MEFVLGWVFLVTLLKGVQCDVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCAASGFTFSNYMSWVRQAP	60
LV1.1.33	1	MDWSWRILYLAVAVATGVHSQVLLVQSGAEVRKPGASVKIFCKASGYSETDYMHWRQAP	60
TR-FIG-17	61	GKGLQEVAYIRYNGGNIYYADSVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLKTED-ATYYCAREGN	119
LV3.1.13	61	GKGLQVAVINRNGQDIWYADSVKGRFTISRDNKNTLDLLMNSLKTEDTATYYCARSGT	120
LV1.1.33	61	EQGLEWMGRITDPEDGSTSYAQKFQGRLLTLTADTSTNTAYMELSSLRSADTAMYYCARLLY	120
TR-FIG-17	121	DVDYADDYWGQALVTVSSETSSRPNLFPLITC	152
LV3.1.13	121	TIATSYVYWGQALVTVSSETSSRPNLFPLITC	153
LV1.1.33	121	--RGYFDYWGQALVTVSSETSSRPNLFPLITC	151

Dementsprechend zeigen die von Werner et al. (2005) entwickelten Primer eine 100%ige Übereinstimmung mit den Sequenzen der VH3-Familie jedoch nur eine 67%ige („FR2“), respektive 57%ige („FR3“) Übereinstimmung mit den Sequenzen der VH1-Familie (s. Abbildung 36)

Abbildung 36: Vergleich der Primersequenzen von Werner et al. (2005) mit Sequenzen der VH1 und VH3-Familie

Primer „FR2“	-----CCAGGCTCCAGGGAAGGG-----	18
LV3.1.33_FR2	CTGGGTCCGCTCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTCGCATAT	46
LV1.1.33_FR2	CTGGTTGCGACAGGCTCCTGAACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGA	46
Primer „FR3“	-----TCCAGAGACAACGCCAAGAAC-----	21
LV3.1.33 FR3 (Ausschnitt)	GGGCCGATTCAACGCTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTC	45
LV1.1.33 FR3 (Ausschnitt)	GGGCAGACTCACCTGACAGCAGACACATCCACAAACACAGCCTA	45

Trotz der nicht 100%igen Übereinstimmung der Primer von Werner et al. (2005) mit den Sequenzen der VH1-Familie kann es jedoch möglich sein, dass schon die bestehende Übereinstimmung ausreicht, um Mitglieder der VH1-Familie zu amplifizieren.

Da in der Studie von Werner et al. (2005) lediglich die Übersetzung in die Proteinsequenzen der dort analysierten Gensequenzen aufgeführt ist, ist ein direkter Vergleich mit den Nukleotidsequenzen nicht möglich.

Die Feststellung, dass alle von Werner et al. (2005) mit der SMARTTM RACE-Technik erzeugten Sequenzen der schweren Kette der VH3-Familie zuzuordnen sind, stimmen mit den in dieser Arbeit gefundenen Verhältnissen überein. Sowohl mit der SMARTTM RACE-Technik, als auch mit der CapFishingTM-Methode konnten lediglich Sequenzen von Mitgliedern der VH3-Familie erzeugt werden. Beide Methoden benutzen mRNA als Ausgangsmaterial, was auf eine stärkere Expressierung der VH3-Familie hinweisen kann.

5.3 Horizontale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zur Erzeugung von Gelen für die horizontale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese weitestgehend gleichartige Methode wurde von Izzo et al. (2006) beschrieben. Unterschiede liegen jedoch im Material des Gießblockes und der Erzeugung der Gele selbst. Für den in dieser Arbeit verwendeten Gießblock wurde Aluminium als Material gewählt. Aluminium bietet im Vergleich zu Plexiglas bedeutend bessere Formbeständigkeit. Im Laufe von Vorversuchen zeigte sich, dass gerade größere Gele zum Anhaften am Gießblock neigen. Daher war eine Silikonisierung des Blockes vorteilhaft, die zu einer besseren Lösung des polymerisierten Gels von der so behandelten Oberfläche führt (Sambrook et al., 1989). Für die Silikonisierung wird die aufgetragene Lösung ca. eine

Stunde bei 120°C getrocknet. Dieses Verfahren muss regelmäßig erneut durchgeführt werden. Für die dadurch entstehende wiederkehrende Erhitzung und Abkühlung des Blockes ist Aluminium besser geeignet als Plexiglas. In der Studie von Izzo et al. (2006) wird die Glasplatte für die Erzeugung der Gele auf Ober- und Unterkante des Gießblockes aufgelegt. Durch die in dieser Arbeit beschriebene Methode, dem Auflegen der Glasplatte auf die Unterkante des Blockes und die Stege für die Taschen, konnte die Gefahr des Einschlusses von Luftblasen deutlich verringert werden.

5.4 DNS-Isolierung und Qualität der gewonnenen DNS

DNS unterliegt nach der Entnahme von Geweben aus lebenden Organismen oder dem Tod eines Organismus der Degradation durch autolytische und fäulnisbedingte Prozesse (Cina, 1994). Daher ist der Frischzustand des Gewebes für die Qualität der DNS entscheidend. Die gleichen Vorgänge, die zur Degradation der DNS führen, betreffen auch die übrigen Zellbestandteile und führen daher auch zu morphologischen Veränderungen der Zelle. Um diesen morphologischen Veränderungen entgegenzuwirken, kann das Gewebe fixiert werden. Diese Fixierung geschieht bei Gewebe, das zur histologischen Untersuchung bestimmt ist, im Regelfall in einer 10%igen Formaldehydlösung (Srinivasan et al., 2002). Jedoch zeigt die DNS, die aus formalinfixiertem Gewebe isoliert wird, deutliche Qualitätsminderung (Serth et al., 2000), wobei die Dauer der Fixation negativ die Qualität beeinflusst (Ferrer et al., 2007). Formalin interagiert unter anderem mit der DNS, indem es zu einer Kreuzvernetzung zwischen Proteinen und den Nukleinsäuren führt (Douglas und Rogers, 1998).

Eine der häufigsten Methoden bei der Isolierung von DNS aus formalinfixiertem Gewebe ist der Einsatz von Proteinasen zur Lösung der Quervernetzung. Dieses Prinzip kam auch bei den formalinfixierten Proben in dieser Arbeit zum Einsatz. Für die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben mussten die Proben zuvor entparaffiniert werden. Bei dem Puregene® DNA Purification Kit wird dies mit Xylol und Alkohol durchgeführt. Die anschließende Extraktion der DNS wird durch Proteinfällung mit folgender Fällung der DNS erreicht. Jedoch war hier die Anzahl von Proben mit qualitativ ausreichender DNS, überprüft durch die Amplifizierung des 300 bp- und des 100 bp-großen Fragmentes, nicht zufriedenstellend. Daher wurde eine zweite Methode der DNS-Isolierung angewandt, die eine Kombination aus zwei veröffentlichten Protokollen darstellt (Coombs et al., 1999; Shi et al., 2004). Shi et al. (2004) schlagen zur schnellen und effektiven Extraktion eine Wärmebehandlung der Paraffinproben bei 100°C in Natronlauge vor, da unter sauren

Bedingungen die DNS bei der Extraktion zerstört wird. Die optimale, in der Studie festgestellte Konzentration der Natronlauge war 0,1 M.

Coombs et al. (1999) benutzten eine Erwärmung der Proben auf 90°C unter Zugabe von 0,5% Tween[®] 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat), einem nichtionischem Tensid, welches in Konzentrationen von 0,05% bis 0,5% Säugetierzellen lysiert. An die Wärmebehandlung schloss sich eine vergleichsweise kurze (3 Stunden) Behandlung der Proben mit Proteinase K an. Die Extraktion erfolgte unter Zugaben von Chelex 100 und Chloroform. Chelex 100 ist ein Styren-Divinylbenzen-Kopolymer, das Iminodiazetationen beinhaltet, welche als komplexbildende Gruppen fungieren und eine hohe Aktivität für polyvalente Metallionen aufweisen. Chelex 100 bindet DNS und kann so zur Extraktion von genomischer DNS benutzt werden (Walsh et al., 1991). Das Protokoll von Coombs et al. (1999) wurde dahingehend modifiziert, dass die 0,5%ige Tween[®] 20-Lösung mit 0,1 M Natronlauge als Lösungsmittel angesetzt wurde und die Temperatur für die Hitzebehandlung auf 100°C erhöht wurde. Auch wurde die von Coombs et al. (1999) vorgeschlagene Dauer der Hitzebehandlung von 10 Minuten auf die von Shi et al. (2004) benutzten 20 Minuten verlängert.

Mit der modifizierten Hitzebehandlung konnte durch das Wegfallen der Übernacht-Inkubationen, welche bei der Extraktion mit dem Puregene[®] DNA Purification Kit notwendig sind, eine Verkürzung der Prozedurdauer von insgesamt ca. 3 Tagen auf wenige Stunden erreicht werden.

5.5 Limitierung der Klonalitätsanalyse von B-Zell-Lymphomen mit der PCR

5.5.1 Falsch negative Resultate

Ein großes Limit der Klonalitätsdiagnostik von B-Zell-Lymphomen mit der PCR liegt in der Möglichkeit, dass eine vorhandene monoklonale Population nicht von dem Primersystem erkannt wird. Im Bereich der Humanmedizin ist dies bei ca. 30% der Lymphome der Fall (Diss et al., 2002). Dies kann auf mehreren grundsätzlichen Mechanismen beruhen (Algara et al., 1993; Medeiros und Carr, 1999). Ein Problem liegt in dem Einsatz der Consensus-Primer und der familienspezifischen Primer. Diese Primer sind entwickelt, um möglichst viele Sequenzen zu binden. Im Umkehrschluss passen sie auf die einzelnen Sequenzen nicht absolut perfekt, so dass einzelne Sequenzen unter Umständen nicht erkannt werden, d.h. hier der Primer nicht bindet (Medeiros und Carr, 1999; van Dongen et al., 2003). Bei der Katze kommt hinzu, dass mit den in dieser Arbeit und in der Studie von Werner et al. (2005)

gefundenen Varianten das Repertoire der Gene der schweren Kette mit großer Sicherheit nur unvollständig abgedeckt wird. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass einige lymphatische Neoplasien a priori von den bestehenden Primersystemen nicht erkannt werden können. Eine zweite Ursache für eine fehlende Bindung der Primer liegt in der somatischen Hypermutation. Da hierbei auch die dritte Framework-Region betroffen ist (Shapiro et al., 1999), können die hierbei entstehenden Punktmutationen auch die Bindungsstelle des FR3-Primers betreffen und die Bindungsfähigkeit des Primers herabsetzen oder eine Bindung vollständig verhindern. Dies konnte bei humanen Follikelzenter-Lymphomen und diffusen großzelligen Lymphomen, welche als Neoplasien von Lymphozyten nach Antigenkontakt angesehen werden, gezeigt werden (van Dongen et al., 2003). Werner et. al (2005) konnten das Phänomen an von ihnen untersuchten feline diffusen großzelligen Lymphomen mit fehlender Bindung der FR3-Primer demonstrieren. Eine dritte Möglichkeit der fehlenden Primerbindung besteht bei Lymphomen, bei denen die Sequenzen der schweren Kette durch chromosomale Abnormalitäten wie Translokationen, Inversionen oder Deletionen entscheidend verändert wurde. In humanen Lymphomen sind einige Translokationen regelmäßig nachweisbar, wie z.B. t(14;18) bei Follikelzenter-Lymphomen und großzelligen Lymphomen (Fukuhara et al., 1979) oder t(11;14) bei Mantelzell-Lymphomen (de Boer et al., 1997). Bei der Katze konnte beispielsweise eine Translokation t(A2;D3) bei zwei T-Zell-Lymphomen festgestellt werden (Wu et al., 1995). Ein falsch negatives Ergebnis kann auch dann entstehen, wenn die Menge amplifizierbarer DNS nicht ausreicht, um eine sichtbare Bande zu erzeugen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Überprüfung der DNS durch Amplifikation von 300 bp und 100 bp-großen Fragmenten vermieden, indem nur solche Proben der Klonalitätsanalyse unterzogen wurden, bei denen wenigstens das 100 bp-große Fragment sicher amplifiziert werden konnte.

5.5.2 Falsch polyklonale Resultate

„Falsch polyklonale“ Resultate entstehen, wenn bei bestehender monoklonaler Population die Klonalitätsanalyse als Ergebnis eine polyklonalen Population erbringt. Ursache hierfür ist das gleichzeitige Vorliegen einer monoklonalen Tumorphpopulation und einer polyklonalen Population von B-Zellen im selben Gewebe, wie z.B. tumorinfiltrierende Lymphozyten oder gewebeständige Lymphozyten. Da das Diagnostiksystem dafür geschaffen ist, möglichst viele rearrangierte Varianten zu erkennen, werden im optimalen Fall alle im Gewebe vorkommenden Lymphozyten erkannt (Algara et al., 1993). Dies bedeutet, dass die polyklonalen Varianten mit den monoklonalen als Zielsequenz für die Primerbindung

konkurrieren (McCarthy, 1997). Liegt die monoklonale Population im Vergleich zur polyklonalen Population in zu geringer Konzentration vor, können die polyklonalen Banden in der Elektrophorese schwache monoklonale Banden überdecken. Humanmedizinische Studien beschreiben für die PCR eine Sensitivität von 1%-10% (McCarthy et al., 1990; Trainor et al., 1990; van Dongen et al., 2003) für Gewebe mit polyklonalem Hintergrund. Dies bedeutet, dass in einer DNS-Isolierung von 100 Zellen 1 bis 10 neoplastische Lymphozyten vorhanden sein müssen, um als monoklonale Population erkannt zu werden, wenn die übrigen der 100 Zellen überwiegend aus Lymphozyten bestehen. Dagegen steht eine Sensitivität von 5‰ in Geweben ohne reaktive Lymphozyten (McCarthy et al., 1991). Dies bedeutet, dass zur Erkennung der monoklonalen Population in einer DNS-Isolierung von 1000 Zellen lediglich 5 neoplastische Lymphozyten vorhanden sein müssen, wenn die übrigen der 1000 Zellen nicht zum lymphatischen Gewebe gehören.

Erkennen die Primer aus oben genannten Gründen eine monoklonale Population in einem Gewebe mit reaktiven Lymphozyten nicht, wird bei Vorliegen einer ausreichend großen polyklonalen Population nur diese amplifiziert und ergibt ein polyklonales Muster in der Elektrophorese (Werner et al., 2005).

5.5.3 Falsch klonale Resultate

5.5.3.1 Pseudomonoklonal

Bei der Analyse von Proben mit wenigen Lymphozyten trat bei der PCR-gestützten Klonalitätsdiagnostik ein Phänomen auf, das von den Autoren als „Pseudomonoklonalität“ (Elenitoba-Johnson et al., 2000) bzw. „Pseudoklonalität“ bezeichnet wurde. Hierbei zeigten die Proben, obwohl histologisch und immunhistologisch als reaktiver Prozess erscheinend, ein monoklonales Muster in der Elektrophorese (Elenitoba-Johnson et al., 2000; Hoeve et al., 2000). Ursache hierfür ist eine zu geringe Menge an Zielsequenzen, wie sie bei sehr kleinen Proben oder bei Proben mit schlechter DNS-Qualität vorkommt. Dies konnte durch Amplifikation von Verdünnungen reaktiven Lymphgewebes gezeigt werden. Hier konnte zunächst ein polyklonales Muster, mit zunehmenden Verdünnungen jedoch ein inkomplettes polyklonales Muster (s.u.), ein oligoklonales Muster (s.u.) und schließlich ein pseudomonoklonales Muster erzeugt werden (Elenitoba-Johnson et al., 2000; Hoeve et al., 2000).

Das Phänomen der Pseudomonoklonalität wird durch die exponentielle Amplifikation, der in den ersten PCR-Zyklen gebildeten Produkte erklärt. Hierbei können zufällig einzelne Klone einer kleinen polyklonalen Population bevorzugt amplifiziert werden (Moore et al., 2005).

Die Zufälligkeit, in der dies geschieht, sorgt jedoch dafür, dass die Banden in verschiedenen PCR-Reaktionen unterschiedliche Größen zeigen (Elenitoba-Johnson et al., 2000).

Aus diesem Grund sollten, wie auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, die PCR-Reaktionen immer mindestens im Doppelansatz durchgeführt werden.

5.5.3.2 Oligoklonal

Erscheint in der Elektrophorese ein reproduzierbares Bandenmuster mit 3 bis 5 scharfen Banden, wird dieses Ergebnis als Hinweis auf eine Oligoklonalität der untersuchten Probe gewertet (Werner et al., 2005). Dies wird auf eine Prädominanz einiger weniger, durch die Selektion im Zuge des Antigenkontakts bevorzugter Lymphozyten-Subklone zurückgeführt. Bei T-Zellen konnte dieses Phänomen bei humanen Patienten in Zusammenhang mit Epstein-Barr-Virus- oder Zytomegalievirus-Infektionen beobachtet werden (van Dongen et al., 2003). Eine humanmedizinische Studie zeigte jedoch auch Oligoklonalität bei 30% der Fälle von Vorläufer-B-Zell-Leukämien (Szczepanski et al., 2001). Jedoch kann, wie bereits erwähnt, die Oligoklonalität ähnlich wie die Pseudoklonalität auch ein Hinweis auf geringe Mengen an Lymphozyten bzw. geringe Mengen amplifizierbare DNS in der Ausgangsprobe sein (Elenitoba-Johnson et al., 2000; Hoeve et al., 2000).

5.6 Kriterien für die Interpretation der Elektrophorese-Ergebnisse

Angelehnt an die Vorschläge von Hoeve et al. (2000) modifiziert nach Werner et al. (2005) können die Ergebnisse der Elektrophorese folgendermaßen eingestuft werden:

1. Monoklonal: Eine oder zwei *reproduzierbare* (Werner et al., 2005) Banden im erwarteten Größenbereich, entweder selbständig oder vor dem Hintergrund mehrerer schwächerer (polyklonaler) Banden. Der Fall von zwei reproduzierbaren Banden kann als biallelische VDJ-Rekombination der Ursprungszelle gewertet werden (Signoretti et al., 1999; van Dongen et al., 2003; Werner et al., 2005).
2. Oligoklonal: Drei bis *fünf* (Werner et al., 2005) reproduzierbare Banden, möglicherweise vor einem polyklonalem Hintergrund.
3. Polyklonal: Eine Leiter von 10 bis 20 Banden, die mit Gaußscher Normalverteilung über den erwarteten Größenbereich verteilt sind.
4. Inkomplett polyklonal: Weniger als 10, d.h. **6 bis 10** (*durch die engere Definition der Oligoklonalität*) Banden im erwarteten Größenbereich, die zufällig verteilt sind, unterschiedliche Stärke haben und bei wiederholten Experimenten variieren.
5. Pseudoklonal (Werner et al., 2005): Eine oder mehrere, gut abgrenzbare, nicht reproduzierbare Banden. (In Hinblick auf die vorhergehenden Definitionen kann hier

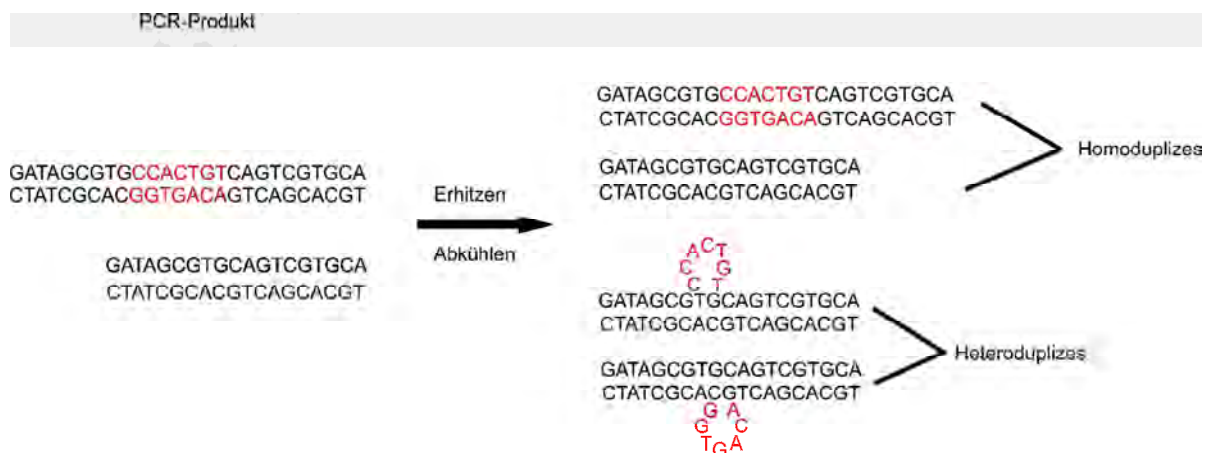
bei ein bis zwei nicht reproduzierbaren Banden von „**pseudomonoklonal**“ und von drei bis fünf nicht reproduzierbaren Banden als „**pseudooligoklonal**“ gesprochen werden.)

6. Kein Signal: Keine Bande im erwarteten Größenbereich oder schwache Banden außerhalb der erwarteten Produktlänge.

5.7 Heteroduplexanalyse

Mit der Heteroduplexanalyse kann die Monoklonalität eines unklaren Ergebnisses überprüft werden. Bei der Heteroduplexanalyse werden die PCR-Produkte bei hoher Temperatur denaturiert, d.h. die Doppelstränge lösen sich, und werden bei niedrigerer Temperatur wieder aneinander angenähert (Garcia-Sanz et al., 1999; Gonzalez et al., 1999). Bei Vorliegen einer polyklonalen Population werden durch diese Methode Heteroduplexe gebildet. Heteroduplexe bilden sich dann, wenn ein PCR-Produkt vorliegt, in dem sich die einzelnen Moleküle sehr ähnlich sind, aber in einigen Basen unterscheiden. Durch die Denaturierung wird die doppelsträngige DNS getrennt. Bei der Wiederannäherung paaren in einem heterogenen Produkt nicht nur die homologen Stränge (Homoduplexe), sondern die sich ähnlichen Stränge binden in übereinstimmenden Bereichen. An Stellen mit nicht übereinstimmender Sequenz entstehen in diesen Molekülen ungepaarte Basen, die für veränderte Laufeigenschaften in der Elektrophorese sorgen (Cotton, 1997). Wenn sich, wie bei den Genen der schweren Kette, die Moleküle nicht nur in der Basenzusammensetzung, sondern auch in der Anzahl der Basen unterscheiden, bilden sich Schleifen in der DNS (s. Abbildung 37). Dies verstärkt den Effekt. Die veränderten Laufeigenschaften – die Heteroduplexe migrieren langsamer in der Elektrophorese – können eine polyklonale Population deutlich werden lassen, da diese oberhalb der erwarteten Größe migrieren. Die Homoduplexe können dagegen im erwarteten Größenbereich deutlicher hervortreten (van Dongen et al., 2003).

Abbildung 37: Entstehung der Homo- und Heteroduplexe durch Erhitzung und Abkühlung der PCR-Produkte



5.8 Aussagekraft der Elektrophorese-Resultate

Aufgrund der systemimmanenten Möglichkeit falsch negativer bzw. falsch polyklonaler Resultate kann die PCR-gestützte Klonalitätsdiagnostik lediglich bei einem positivem monoklonalem Ergebnis, welches durch die oben genannten Kriterien verifiziert ist, dem Untersucher einen deutlichen Hinweis auf eine monoklonale Population geben. Somit kann in einem solchen Fall der Untersucher durch Kombination der histologischen, immunhistologischen und molekularbiologischen Befunde in der Lage sein, einen Tumor von einem reaktiven lymphatischen Gewebe abzugrenzen.

Eine umgekehrte Abgrenzung, d.h. der Ausschluss eines Tumors im untersuchten Gewebe ist aufgrund der oben beschriebenen Möglichkeit der Nichterfassung einer klonalen Population nicht möglich.

5.9 Analyse der mit dem Diagnostiksystem amplifizierten Proben

5.9.1 Duplizierung der FR1-spezifischen Bande der VH1-Positivkontrolle

Bei der Amplifikation der Proben mit dem Diagnostiksystem wurde für die Kontrolle der VH1-spezifischen Primer ein Plasmid mit einem Insert aus Genen der VH1-Familie mit beiden Sense-Primern in Verbindung mit den Antisense-Primern amplifiziert. Dabei konnte festgestellt werden, dass im Bereich der Bande des V1FR1-Primers eine zusätzliche schwache Bande kurz oberhalb der erwarteten Bande erschien.

Analysen der Sequenz der Inserts sowie des Plasmids konnten keine zusätzliche Bindungstellen der benutzen Primer erkennen lassen. Bei Amplifikation des Plasmids mit den Sense-Primern in Einzelreaktionen konnte die Bande nicht mehr erzeugt werden (s. 4.3.6.) Dies weist darauf hin, dass diese zusätzliche Bande möglicherweise durch eine Interaktion der beiden Amplifikate miteinander entsteht. Grundsätzlich können die Einzelstränge beider Amplifikate miteinander binden, da das Amplifikat mit dem V1FR3-Primer dem 3'-Ende des Amplifikats mit dem V1FR1-Primers entspricht.

Möglich wäre z.B. die Bildung eines Moleküls, das im Bereich des 3'-Endes doppelsträngig ist und im Bereich des 5'-Endes einzelsträngig. Wenn nun die Konformation des Einzelstranges eine Abbremsung des Moleküls bewirkt, könnte diese zur Bildung einer zusätzlichen Bande führen.

5.9.2 Diskussion der Ergebnisse der mit dem Primersystem untersuchten Proben

Nachfolgend werden die Ergebnisse der mit dem Primersystem untersuchten Proben diskutiert. Grundlage der Diskussion sind die histologische und immunhistologische Klassifizierung der Proben (s. 3.2 und 8.5 - 8.7), die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung (s. 4.3.5) sowie in einzelnen Fällen die Qualität der DNS (s. Tabelle 59).

5.9.2.1 B-Zell-Lymphome

5.9.2.1.1 Fall 3020/93

Dieser Tumor ist nach histologischer und immunhistologischer Klassifikation ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, welches die Niere infiltriert (s. Abbildung 43).

Die PCR-Reaktion ergibt in der Elektrophorese (s. Abbildung 18) nach den oben beschriebenen Kriterien ein monoklonales Muster auf schwachem inkomplett polyklonalen Hintergrund mit zwei Banden für die Amplifikation mit den VH1-spezifischen Primer in der Framework 3-Region. Die Primer für die VH3-Familie ergeben für beide Frameworkregionen ein polyklonales Muster, wobei bei dem FR1-spezifischen Primer eine starke Fluoreszenz im mittleren Abschnitt des Musters zu erkennen ist, welche jedoch nach Heteroduplexanalyse verschwindet und auf die Häufung von Klonen ähnlicher Größe aufgrund der Gaußschen Normalverteilung zurückzuführen ist.

Aufgrund der Elektrophorese-Ergebnisse in Kombination mit den histologischen und immunhistologischen Befunden kann dieser Tumor als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit biallelischem Rearrangement der Gene der VH1-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.2 Fall 3597/06

Dies ist histologisch und immunhistologisch ebenfalls ein die Niere infiltrierendes, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (s. Abbildung 44).

Die Amplifikation mit dem Diagnostiksystem (s. Abbildung 18) ergibt kein Signal für die VH1-spezifischen Primer, jedoch jeweils ein monoklonales Muster für die Primer der VH3-Familie, wobei zwei reproduzierbare Banden des FR1-spezifischen Primers vor einem pseudomonoklonalem und eine reproduzierbare Bande des FR3-spezifischen Primers vor einem pseudooligoklonalem Hintergrund liegen.

Kombiniert mit den histologischen und immunhistologischen Ergebnissen kann dieser Tumor als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit biallelischem Rearrangement der Gene der VH3-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.3 Fall T383/05

Histologisch und immunhistologisch konnte auch dieser Tumor als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit Manifestation in der Niere klassifiziert werden (s. Abbildung 45).

Die Ergebnisse der PCR (s. Abbildung 19) ergaben ein monoklonales Muster mit einer reproduzierbaren Bande im Bereich des FR3-spezifischen Primers der VH3-Familie. Es erfolgte keine Amplifikation der VH1-spezifischen Sequenzen und der FR1-spezifischen Sequenzen der VH3-Familie. Die fehlende Bindung in diesem Bereich kann auf die unter 5.5.1 beschriebenen Gründe zurückzuführen sein, wobei die Qualität der DNS grundsätzlich die Amplifikation eines Fragmentes der entsprechenden Größe zulässt (s. Tabelle 59). Das Fehlen eines Signals für VH1-spezifische Sequenzen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass dieser Tumor keinen polyklonalen Hintergrund, d.h. keine Infiltration mit reaktiven Lymphozyten beider Familien zu haben scheint.

Somit kann dieser Tumor als großzelliges B-Zell-Lymphom mit Rearrangement der Gene der VH3-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.4 Fall T1528/07

Auch dieser Tumor ist ein die Niere infiltrierendes, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, wie durch die histologische und immunhistologische Untersuchung festgestellt werden konnte (s. Abbildung 46).

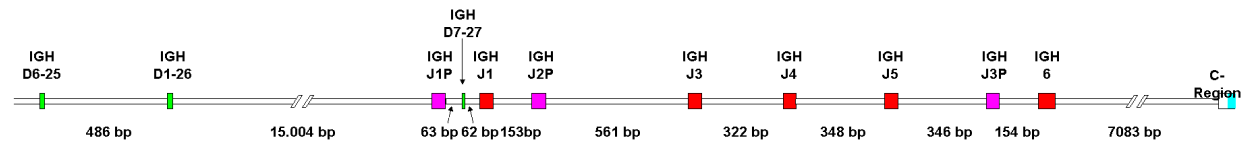
Bei diesem Tumor konnte für beide VH3-spezifischen Primer ein monoklonales Muster ermittelt werden (s. Abbildung 19). Somit kann dieser Tumor ebenfalls als großzelliges B-Zell-Lymphom mit Rearrangement der Gene der VH3-Familie klassifiziert werden.

Bei der Amplifikation dieses Tumors konnte ein Phänomen beobachtet werden, welches auch bei der PCR-gestützten Klonalitätsanalyse lymphatischer Neoplasien in der Humanmedizin beschrieben ist. Zusätzlich zu den Banden im erwarteten Größenbereich traten bei der Amplifikation Banden im Bereich von 450 bis 550 Basenpaaren auf.

Dies kann mit der Bindung der Antisense-Primer in nicht-rearrangierten J-Segmenten erklärt werden (Deane und Norton, 1990). Diese werden erst im Zuge des Spleißens, d.h. erst nach der Transkription der DNS, entfernt und liegen damit in der B-Lymphozyten-DNS unmittelbar in Richtung 3'-Ende zu den rearrangierten Genen (vgl. Abbildung 1) (Rabbitts, 1978). Die Abstände zwischen den einzelnen Mitgliedern der J-Region sind im humanen Genom kurz genug, um mit einer gewöhnlichen PCR amplifiziert zu werden. Abbildung 38 zeigt dies schematisch in einem Ausschnitt der genomischen Verteilung der humanen D- und

J-Gene, erstellt auf Grundlage der genomischen Sequenzen (GeneBank Accession-Number: NG_001019)

Abbildung 38: Schema der genomischen Verteilung der humanen D- und J-Gene (Ausschnitt)



Dass dieses Phänomen auch bei der Katze auftritt, konnte durch Aufreinigung, Klonierung und Sequenzierung einer solchen Bande außerhalb der erwarteten Größe gezeigt werden. Abbildung 39 zeigt die Sequenz der Bande. Das Vorliegen des Heptamers und des Nonamers in dem Bereich zwischen den beiden J-Regionen zeigt, dass es sich bei der weiter Richtung 3'-Ende der DNS gelegenen Region um eine nicht rearrangierte Sequenz handelt.

Abbildung 39: Sequenz der oberhalb des erwarteten Größenbereich liegenden Bande

1	GTGGCCTCTG	GATTACACCTT	CAGTAGCTAC	TACATGAGCT	GGGTCCGCCA	GGCTCCAGGG
61	AAGGGGCTGC	AGTGGGTCGC	ATATATTAGT	AGTAGTGGAG	GTAGCATATA	CTACGCAGAC
121	TCCGTGAAGG	GCCGATTAC	CATCTCCAGA	GACAACGCCA	AGAACACGCT	GTATCTGCAG
181	ATGAACAGCC	TGAAGACCGA	GGACACGGCC	ACATATTACT	GTGCTCGGGG	GGTCCC
241	gactcctggg	gccaaaggagc	cctggtgacg	GTGTCTCAG	GTGAGTCCTC	CCGGCTTTCC
301	TCTCCTCTCT	CTGTCGGGAG	GTTTGGCTG	CATTGGGGA	GAAAACGGAG	GGTGCCAGGG
361	TCTCGGACCT	AGGGCTGGCT	TGGTGGCCAG	GCTCTCCGGG	GACCTCAGCC	ACCCTCAGCT
421	TCAGGGGCCA	CCTGGTCCTC	TCAGCCTCAC	TGGCTGTGAT	CTGAGGTGGA	CCGAGGCCTT
481	AGCCAGGCCC	C <u>ACTTCTTGT</u>	CTGGGGCCCC	ACCAACATTG	TCA <u>CAATGTG</u>	acaactggtt
541	caactactgg	ggccacggaa	ccct			

GRAU UNTERLEGT: V-Region

UNTERSTRICHEN: N-Region

KURSIV: D-Region

kleinbuchstaben: J-Regionen

ACTTCTTGT: Nonamer

CAATGTG: Heptamer

5.9.2.1.5 Fall 2253/97

Dieser histologisch und immunhistologisch als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom im Darm klassifizierte Tumor (s. Abbildung 47) zeigt für die VH1-spezifischen Primer im Bereich des FR3-spezifischen Primers eine im Doppelansatz, jedoch nicht in wiederholten Versuchen reproduzierbare Bande. Nach Durchführung der Heteroduplexanalyse können lediglich zwei Banden unterschiedlicher Größe gesehen werden. Für die VH3-spezifischen Primer besteht ein pseudooligoklonales Muster für den FR1-spezifischen Primer, sowie ein inkomplett polyklonales Muster für den FR3-spezifischen Primer (s. Abbildung 21). Mit der Heteroduplexanalyse konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die Ergebnisse dieses Tumors weisen auf das Vorliegen einer geringen Menge Zielsequenz hin. Da die verwendete Probe eine angemessene Größe und auch eine gute Zelldichte aufwies (s. Abbildung 47) kann hier eine starke Fragmentierung der DNS im Ausgangsmaterial als Ursache in Frage kommen. Diese Annahme wird durch die Unfähigkeit, ein 300 bp-großes Fragment zu amplifizieren, unterstützt.

Durch die Elektrophorese-Ergebnisse konnte bei dieser Probe keine eindeutige Monoklonalität nachgewiesen werden, d.h. in diesem Fall können die molekularbiologischen Befunde nicht zur Unterstützung der histologischen und immunhistologischen Befunde dienen.

5.9.2.1.6 Fall 2074/95

Dieser ebenfalls aus dem Darm stammende histologisch und immunhistologisch als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom diagnostizierte Tumor (s. Abbildung 48) zeigt für den FR3-spezifischen Primer der VH1-Familie in der ersten Amplifikation zwei Banden unterschiedlicher Größe in den beiden Reaktionen des Doppelansatzes (s. Abbildung 21). In der Wiederholung der Amplifikation lassen sich zwei Banden identischer Größe in den beiden Reaktionen des Doppelansatzes und eine kleinere Bande in einer der beiden Reaktionen erkennen. Letztere Bande verschwindet in der Heteroduplexanalyse. Mit der zweiten Amplifikation konnte eine reproduzierbare Bande für den FR3-spezifischen Primer der VH1-Familie ermittelt werden. Inwieweit die kleinere Bande der zweiten Amplifikation eine Reproduktion der kleineren Bande der ersten Replikation darstellt, d.h. Hinweis auf ein biallelisches Rearrangement gibt, lässt sich aufgrund der leicht unterschiedlichen Laufeigenschaften der beiden Gele nicht exakt feststellen. Die Amplifikation mit dem FR3-spezifischen Primer der VH3-Familie ergibt ein inkomplett polyklonales Muster.

Somit kann dieser Tumor auf der Kombination von histologischen, immunhistologischen und molekularbiologischen Befunde als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit Rearrangement der Gene der VH1-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.7 Fall T7795/05

Dieser Tumor aus dem Auge einer Katze wurde histologische und immunhistologisch ebenfalls als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom eingestuft (s. Abbildung 49).

Die Ergebnisse der Elektrophorese (s. Abbildung 22) zeigen bei diesem Tumor kein Signal für die VH1-spezifischen Primer, eine nicht reproduzierbare Bande für den FR1-spezifischen Primer der VH3-Familie und eine reproduzierbare Bande vor einem pseudooligoklonalem Hintergrund für die FR3-spezifischen Primer der VH3-Familie.

Somit kann dieser Tumor mit Hilfe der molekularbiologischen Befunde kombiniert mit Histologie und Immunhistologie als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit Rearrangement der VH3-Gene diagnostiziert werden.

Die fehlende Reproduzierbarkeit der Bande für den FR1-spezifischen Primer der VH3-Familie kann ihre Ursache in der Qualität der Ausgangs-DNS haben, da bei dem Versuch der Amplifikation des 300 bp-großen Fragmentes lediglich eine schwache Amplifikation erreicht werden konnte.

5.9.2.1.8 Fall 940/97

Bei diesem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom aus dem Darm (s. Abbildung 50) konnten für die FR3-spezifischen Primer beider Familien ein monoklonales Muster ermittelt werden (s. Abbildung 22).

Damit kann dieser Tumor durch Histologie, Immunhistologie und molekularbiologische Befunde als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit biallelischem Rearrangement der Gene sowohl der VH1- als auch der VH3-Familie klassifiziert werden.

5.9.2.1.9 Fall T7192/06

Bei diesem histologisch und immunhistologisch als Follikelzentrums-Lymphom vom Typ II klassifizierten Tumor aus dem Lymphknoten (s. Abbildung 51) konnte durch die Amplifikation lediglich ein polyklonales Muster für den FR3-spezifischen Primer der VH1-Familie und die VH3-spezifischen Primer erreicht werden (s. Abbildung 23). Durch die Heteroduplexanalyse konnte hier ebenfalls kein monoklonales Muster aufgezeigt werden.

Die Probe stammt aus einem Lymphknoten, also einem Gewebe mit vielen nicht neoplastischen Lymphozyten, welche das starke polyklonale Muster erzeugen und

möglicherweise eine monoklonale Bande überdecken, wenn eine vorhandene monoklonale Population amplifiziert wurde.

Bei dieser Probe können die molekularbiologischen Befunde nicht zur Unterstützung der histologischen und immunhistologischen Befunde herangezogen werden.

5.9.2.1.10 Fall S1003/04

Dieser durch Histologie und Immunhistologie als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit Manifestation im Pankreas diagnostizierte Tumor (s. Abbildung 52) zeigt wie T7192/06 ein polyklonales Muster für den FR1-spezifischen Primer der VH1-Familie sowie für die VH3-spezifischen Primer (s. Abbildung 23). Auch mit der Heteroduplexanalyse konnte keine Monoklonalität nachgewiesen werden. Auch bei dieser Probe kann keine Unterstützung der histologischen und immunhistologischen Befunde durch die Molekularbiologie erfolgen.

5.9.2.1.11 Zusammenfassung der untersuchten B-Zell-Lymphome

In Tabelle 58 sind die Ergebnisse der untersuchten B-Zell-Lymphome zusammengefasst.

Tabelle 58: Ergebnisse der untersuchten B-Zell-Lymphome

Fall	Histologische/ Immunhistologische Diagnose	Molekularbiologische Diagnose	Familie	DNS- Qualität
3020/92	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Niere)	Monoklonalität nachweisbar (biallelisches Rearrangement)	VH1	300 Basenpaare amplifizierbar
3597/06	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Niere)	Monoklonalität nachweisbar (biallelisches Rearrangement)	VH3	300 Basenpaare amplifizierbar
T383/05	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Niere)	Monoklonalität nachweisbar	VH3	300 Basenpaare amplifizierbar
T1528/07	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Niere)	Monoklonalität nachweisbar	VH3	300 Basenpaare amplifizierbar
2253/97	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Darm)	Monoklonalität nicht nachweisbar	-	100 Basenpaare amplifizierbar
2047/95	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Darm)	Monoklonalität nachweisbar	VH1	100 Basenpaare amplifizierbar
T7795/05	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Auge)	Monoklonalität nachweisbar	VH3	300 Basenpaare (schwach) amplifizierbar
940/97	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Darm)	Monoklonalität nachweisbar (biallelisches Rearrangement)	VH1/VH3	100 Basenpaare (schwach) amplifizierbar
T7192/06	Follikelzentrums-Lymphom Typ II (Lymphknoten)	Monoklonalität nicht nachweisbar	-	300 Basenpaare amplifizierbar
S1003/04	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Pankreas)	Monoklonalität nicht nachweisbar	-	300 Basenpaare amplifizierbar

5.9.3 Lymphatische Hyperplasien

Bei der Untersuchung der histologisch klassifizierten lymphatischen Hyperplasien (als Beispiel s. Abbildung 54) mittels PCR und Elektrophorese konnte bei keiner Probe ein monoklonales Muster erzeugt werden (s. Abbildung 24 bis Abbildung 28).

Die erzeugten Muster variieren von polyklonal über inkomplett polyklonal zu pseudooligoklonal.

Proben, die innerhalb des polyklonalen Musters in beiden Reaktionen des Doppelansatzes Banden gleicher Größe zeigten, wurden zusätzlich der Heteroduplexanalyse unterzogen.

Hierbei konnte ebenfalls bei keiner der Proben ein monoklonales Muster gefunden werden.

5.9.4 T-Zell-Lymphome

Bei keinem der untersuchten T-Zell-Lymphome konnte ein monoklonales Muster erzeugt werden (s. Abbildung 29 bis Abbildung 33). Zum überwiegenden Teil wurde mittels PCR und Elektrophorese kein Signal erzeugt. Lediglich bei der Probe 1883/94 konnte für den FR3-spezifischen Primer der VH3-Familie ein polyklonales Muster gefunden werden, welches wahrscheinlich auf eine kleine Population tumorinfiltrierende B-Lymphozyten zurückzuführen ist, wie sie in den Bildern der Probe (s. Abbildung 53, Bilder 2B, 2C) zu erkennen ist.

Eine Bindung der B-Zell-spezifischen Primer bei T-Zell-Lymphomen wäre aufgrund der so genannten „Linienuntreue“ (bzw. „Linienpromiskuität“) möglich. Mit diesen Begriffen wird die Eigenschaft einiger Lymphome beschrieben, welche die Gene beider Linien (T und B) rearrangieren (Cossman et al., 1988; Felix et al., 1990).

Daher ist durch alleinige Bewertung der rearrangierten Gene eine Zuordnung einer lymphatischen Neoplasie zu B- oder T-Zelllinie nicht möglich.

5.9.5 Beurteilung des diagnostischen Systems

Mit dem System konnte bei sieben der zehn untersuchten Tumoren eine Monoklonalität bestätigt werden. Die Unfähigkeit des Systems, bei den drei übrigen Proben eine Monoklonalität aufzudecken, ist wahrscheinlich in den oben genannten Gründen für falsch negative bzw. falsch polyklonale Befunde begründet.

Auffällig ist jedoch, dass bei keiner der Proben eine deutliche Amplifikation mit dem FR1-spezifischen Primer der VH1-Familie stattfindet. Selbst bei deutlicher Amplifikation der Proben mit dem FR3-spezifischen Primer der VH1-Familie, konnte dies nicht beobachtet werden. Lediglich eine sehr dezente Amplifikation konnte bei einer lymphatischen Hyperplasie (T847/05) gefunden werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass der FR1-spezifische Primer der VH1-Familie bei den untersuchten Proben keine adäquate Bindung zeigt. Die Reaktionsbedingungen scheinen hierfür keine Rolle zu spielen, da mit dem Primer unter gleichen Bedingungen das Insert des VH1-Klons amplifiziert werden konnte. Für eine genauere Untersuchung der Ursachen der fehlenden Amplifikation müsste eine ausgedehnte Analyse der Sequenzen der untersuchten Tumoren erfolgen.

Das entwickelte Diagnostiksystem ist in den Grenzen der PCR-Diagnostik von Lymphomen in der Lage, Monoklonalität aufzudecken und somit dem Untersucher im positiven Falle eine Unterstützung bei der histologischen und immunhistologischen Diagnose zu geben. Das System kann, vor allem aufgrund der unvollständigen Entschlüsselung des feline Genoms, nicht als optimal betrachtet werden. Daher wird es mit fortschreitendem Entschlüsseln der entsprechenden Gene den veränderten Informationen angepasst werden müssen.

6 Zusammenfassung

1. Ziel der Arbeit war es, ein PCR-gestütztes Diagnostiksystem für die B-Zell-Lymphome der Katze zu entwickeln.
2. In der Literaturübersicht wird zunächst ein Überblick über Klassifikation und Ätiologie feline Lymphome gegeben und die Methoden der Klonalitätsdiagnostik werden kurz besprochen. Die molekularbiologischen Grundlagen der Lymphozytenanalyse, hier vor allem das Rearrangement der Gene der schweren Kette und die weiteren Ursachen der Diversität dieser Gene, werden aufgezeigt. Im Weiteren wird der Einsatz der Lymphozytendiagnostik als Klonalitätsmarker bei Mensch, Hund und Katze beschrieben.
3. Zur Entwicklung des Diagnostiksystems mussten die Gene der variablen Region der schweren Kette des feline Immunglobulins analysiert werden und auf Grundlage dieser Analyse ein Primersystem entwickelt werden.
4. Mit verschiedenen Methoden konnten zwei zu den Familien der Gene der schweren Kette des humanen Immunglobulins homologe Familien bei der Katze analysiert werden.
5. Auf Grundlage dieser Analyse konnte ein Diagnostiksystem mit jeweils zwei familienspezifischen Primern für beide Familien entwickelt werden.
6. Mit Hilfe dieses Primersystems konnten bei zehn untersuchten feline B-Zell-Lymphomen in sieben Fällen eine Monoklonalität nachgewiesen werden. Bei jeweils zehn untersuchten lymphatischen Hyperplasien und T-Zell-Lymphomen konnte keine Monoklonalität nachgewiesen werden.

Summary

1. The aim of this study was to develop a PCR-based diagnostic system for the diagnosis of feline B-cell lymphomas.
2. An overview on the classification and etiology of feline lymphomas is given and the methods of clonality analysis are summarized. The molecular basis of lymphocyte analysis is explained with emphasis on the rearrangement of heavy chain genes as well as on further causes of the diversity of these genes. Furthermore, the usage of lymphocyte analysis for clonality analysis in man, dogs and cats is described.
3. For the development of a diagnostic system, feline heavy chain genes had to be analysed to design a system of PCR primers on the basis of this analysis.
4. Using different methods, two families of feline heavy chain genes, homologous to families of the human heavy chain gene could be identified and analysed.
5. Based on this analysis a diagnostic system with two family-specific primers for each family was designed.
6. By use of this system, in 7 of 10 feline B-cell lymphomas monoclonality was detected. No monoclonality was detected in 10 lymphatic hyperplasias and 10 T-cell lymphomas.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lichtmann, A.H., Pober, J.S., (Hrsg), 2000a. Antibodies and antigens. In: Cellular and molecular immunology, 4. Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 41-62.
- Abbas, A.K., Lichtmann, A.H., Pober, J.S., (Hrsg), 2000b. Lymphocyte maturation and expression of antigen receptor genes. In: Cellular and molecular immunology, 4. Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 125-160.
- Adams, A., Lindahl, T., 1975. Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 1477-1481.
- Algara, P., Martinez, P., Sanchez, L., Villuendas, R., Benitez, J., Rivas, C., Piris, M.A., 1993. The detection of B-cell monoclonal populations by polymerase chain reaction: Accuracy of approach and application in gastric endoscopic biopsy specimens. *Hum Pathol* 24, 1184-1188.
- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., Baltimore, D., 1984. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *Embo J* 3, 1209-1219.
- Arnold, A., Cossman, J., Bakhshi, A., Jaffe, E.S., Waldmann, T.A., Korsmeyer, S.J., 1983. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 309, 1593-1599.
- Athas, G.B., Choi, B., Prabhu, S., Lobelle-Rich, P.A., Levy, L.S., 1995. Genetic determinants of feline leukemia virus-induced multicentric lymphomas. *Virology* 214, 431-438.
- Athas, G.B., Starkey, C.R., Levy, L.S., 1994. Retroviral determinants of leukemogenesis. *Crit Rev Oncog* 5, 169-199.
- Aubin, J., Davi, F., Nguyen-Salomon, F., Leboeuf, D., Debert, C., Taher, M., Valensi, F., Canioni, D., Brousse, N., Varet, B., et al., 1995. Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 9, 471-479.
- Baumforth, K.R., Nelson, P.N., Digby, J.E., O'Neil, J.D., Murray, P.G., 1999. Demystified ... the polymerase chain reaction. *Mol Pathol* 52, 1-10.
- Beatty, J.A., Callanan, J.J., Terry, A., Jarrett, O., Neil, J.C., 1998. Molecular and immunophenotypical characterization of a feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a direct role for FIV in B-lymphocyte transformation? *J Virol* 72, 767-771.
- Berman, J.E., Mellis, S.J., Pollock, R., Smith, C.L., Suh, H., Heinke, B., Kowal, C., Surti, U., Chess, L., Cantor, C.R., et al., 1988. Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus. *Embo J* 7, 727-738.
- Bernard, O., Hozumi, N., Tonegawa, S., 1978. Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. *Cell* 15, 1133-1144.
- Besmer, E., Mansilla-Soto, J., Cassard, S., Sawchuk, D.J., Brown, G., Sadofsky, M., Lewis, S.M., Nussenzweig, M.C., Cortes, P., 1998. Hairpin coding end opening is mediated by RAG1 and RAG2 proteins. *Mol Cell* 2, 817-828.
- Beutler, E., Collins, Z., Irwin, L.E., 1967. Value of genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in tracing the origin of malignant tumors. *N Engl J Med* 276, 389-391.
- Bos, J.L., Verlaan-de Vries, M., Jansen, A.M., Veeneman, G.H., van Boom, J.H., van der Eb, A.J., 1984. Three different mutations in codon 61 of the human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids Res* 12, 9155-9163.

- Bourguin, A., Tung, R., Galili, N., Sklar, J., 1990. Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 8536-8540.
- Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., Tonegawa, S., 1978. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1-14.
- Brisco, M.J., Tan, L.W., Orsborn, A.M., Morley, A.A., 1990. Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br J Haematol* 75, 163-167.
- Brouns, G.S., de Vries, E., van Noesel, C.J.M., Mason, D.Y., van Lier, R.A.W., Borst, J., 1993. The structure of the mu/pseudo light chain complex on human pre-B cells is consistent with a function in signal transduction. *Eur J Immunol* 23, 1088-1097.
- Brown, S.W., Chandra, H.S., 1973. Inactivation system of the mammalian X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 195-199.
- Burnett, R.C., Vernau, W., Modiano, J.F., Olver, C.S., Moore, P.F., Avery, A.C., 2003. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol* 40, 32-41.
- Callanan, J.J., Jones, B.A., Irvine, J., Willett, B.J., McCandlish, I.A., Jarrett, O., 1996. Histologic classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections. *Vet Pathol* 33, 264-272.
- Callanan, J.J., McCandlish, I.A., O'Neil, B., Lawrence, C.E., Rigby, M., Pacitti, A.M., Jarrett, O., 1992. Lymphosarcoma in experimentally induced feline immunodeficiency virus infection [corrected]. *Vet Rec* 130, 293-295.
- Campbell, M.J., Zelenetz, A.D., Levy, S., Levy, R., 1992. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol* 29, 193-203.
- Chenchik, A., Moqadam, F., Siebert, P., 1995. Marathon cDNA amplification: A new method for cloning full-length cDNAs. *Clontechniques* X, 5-8.
- Chesnut, R., Grey, H., 1981. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J Immunol* 126, 1075-1079.
- Cho, K.W., Satoh, H., Youn, H.Y., Watari, T., Tsujimoto, H., O'Brien, S.J., Hasegawa, A., 1997. Assignment of the cat immunoglobulin heavy chain genes IGHM and IGHG to chromosome B3q26 and T cell receptor chain gene TCRG to A2q12-->q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 79, 118-120.
- Cho, K.-W., Youn, H.-Y., Okada, M., Satoh, H., Cevario, S., O'Brien, S.J., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1998. Cloning and mapping of cat (*Felis catus*) immunoglobulin and T-cell receptor genes. *Immunogenetics* 47, 226-233.
- Cina, S.J.M.D., 1994. Flow cytometric evaluation of DNA degradation: a predictor of postmortem interval? *Am J Forensic Med Pathol* 15, 300-302.
- Coombs, N.J., Gough, A.C., Primrose, J.N., 1999. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 27, e12.
- Cossman, J., Uppenkamp, M., Sundeen, J., Coupland, R., Raffeld, M., 1988. Molecular genetics and the diagnosis of lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 112, 117-127.
- Cotton, R.G., 1997. Slowly but surely towards better scanning for mutations. *Trends Genet* 13, 43-46.
- Court, E.A., Watson, A.D., Peaston, A.E., 1997. Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J* 75, 424-427.
- Davies, D.R., Chacko, S., 1993. Antibody structure. *Acc Chem Res* 26, 421-427.
- Day, M.J., 1995. Immunophenotypic characterisation of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. *J Comp Pathol* 112, 79 - 96.

- de Boer, C.J., van Krieken, J.H., Schuurin, E., Kluin, P.M., 1997. Bcl-1/cyclin D1 in malignant lymphoma. *Ann Oncol* 8 Suppl 2, 109-117.
- Deane, M., Norton, J.D., 1990. Immunoglobulin heavy chain variable region family usage is independent of tumor cell phenotype in human B lineage leukemias. *Eur J Immunol* 20, 2209-2217.
- Deane, M., Norton, J.D., 1991. Immunoglobulin gene 'fingerprinting': an approach to analysis of B lymphoid clonality in lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 77, 274-281.
- Diaz-Cano, S., 1996. PCR-based alternative for diagnosis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement: principles, practice, and polemics. *Diagn Mol Pathol* 5, 3-9.
- Diss, T.C., Liu, H.X., Du, M.Q., Isaacson, P.G., 2002. Improvements to B cell clonality analysis using PCR amplification of immunoglobulin light chain genes. *Mol Pathol* 55, 98-101.
- Douglas, M.P., Rogers, S.O., 1998. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat Res* 401, 77-88.
- Dreitz, M.J., Ogilvie, G., Sim, G.K., 1999. Rearranged T lymphocyte antigen receptor genes as markers of malignant T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 69, 113-119.
- Dreyer, W.J., Bennett, J.C., 1965. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci USA* 54, 864-869.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., Hood, L., 1980. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981-992.
- Edmundson, A.B., Ely, K.R., Abola, E.E., Schiffer, M., Panagiotopoulos, N., 1975. Rotational allomerism and divergent evolution of domains in immunoglobulin light chains. *Biochemistry* 14, 3953-3961.
- Elenitoba-Johnson, K.S., Bohling, S.D., Mitchell, R.S., Brown, M.S., Robetorye, R.S., 2000. PCR analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in polyclonal processes can yield pseudoclonal bands as an artifact of low B cell number. *J Mol Diagn* 2, 92-96.
- Ellermann, V., Bang, O., 1908. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Centralbl. f. Bakt.* 56, 595-609.
- Endo, Y., Cho, K.W., Nishigaki, K., Momoi, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., Goto, Y., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1997. Molecular characteristics of malignant lymphomas in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Immunol Immunopathol* 57, 153-167.
- Felix, C., Poplack, D., Reaman, G., Steinberg, S., Cole, D., Taylor, B., Begley, C., Kirsch, I., 1990. Characterization of immunoglobulin and T-cell receptor gene patterns in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol* 8, 431-442.
- Ferrer, I., Armstrong, J., Capellari, S., Parchi, P., Arzberger, T., Bell, J., Budka, H., Strobel, T., Giaccone, G., Rossi, G., Bogdanovic, N., Fakai, P., Schmitt, A., Riederers, P., Al-Sarraj, S., Ravid, R., Kretschmar, H., 2007. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol* 30, Epublikation.
- Fey, M.F., Wells, R.A., Wainscoat, J.S., Thein, S.L., 1988. Assessment of clonality in gastrointestinal cancer by DNA fingerprinting. *J Clin Invest* 82, 1532-1537.
- Fleischman, J.B., 1966. Immunoglobulins. *Annu Rev Biochem* 35, 835-872.
- Flug, F., Pelicci, P.G., Bonetti, F., Knowles, D.M., 2nd, Dalla-Favera, R., 1985. T-cell receptor gene rearrangements as markers of lineage and clonality in T-cell neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3460-3464.
- Fukuhara, S., Rowley, J.D., Variakojis, D., Golomb, H.M., 1979. Chromosome Abnormalities in Poorly Differentiated Lymphocytic Lymphoma. *Cancer Res* 39, 3119-3128.
- Gabor, L.J., Canfield, P.J., Malik, R., 1999. Immunophenotypic and histological characterisation of 109 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J* 77, 436-441.

- Gabor, L.J., Jackson, M.L., Trask, B., Malik, R., Canfield, P.J., 2001a. Feline leukaemia virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 79, 476-481.
- Gabor, L.J., Love, D.N., Malik, R., Canfield, P.J., 2001b. Feline immunodeficiency virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 79, 540-545.
- Garcia-Sanz, R., Lopez-Perez, R., Langerak, A.W., Gonzalez, D., Chillon, M.C., Balanzategui, A., Mateos, M.V., Alaejos, I., Gonzalez, M., Van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., 1999. Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma. *Haematologica* 84, 328-335.
- Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., Mathis, D., 1993. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261, 1175-1178.
- Gisselbrecht, C., Gaulard, P., Lepage, E., Coiffier, B., Briere, J., Haioun, C., Cazals-Hatem, D., Bosly, A., Xerri, L., Tilly, H., Berger, F., Bouhabdallah, R., Diebold, J., 1998. Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Blood* 92, 76-82.
- Giudicelli, V., Lefranc, M.P., 1999. Ontology for immunogenetics: the IMGT-ONTOLOGY. *Bioinformatics* 15, 1047-1054.
- Given, D., Yee, D., Griem, K., Kieff, E., 1979. DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 30, 852-862.
- Gold, M.R., Law, D.A., DeFranco, A.L., 1990. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor. *Nature* 345, 810-813.
- Gonzalez, M., Gonzalez, D., Lopez-Perez, R., Garcia-Sanz, R., Chillon, M.C., Balanzategui, A., Mateos, M.V., Alaejos, I., Langerak, A.W., Orfao, A., Van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., 1999. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. *Haematologica* 84, 779-784.
- Goudie, R.B., 1989. A strategy for demonstrating the clonal origin of small numbers of T lymphocytes in histopathological specimens. *J Pathol* 158, 261-265.
- Goudie, R.B., Karim, S.N., Mills, K., Alcorn, M., Lee, F.D., 1990. A sensitive method of screening for dominant T cell clones by amplification of T cell gamma gene rearrangements with the polymerase chain reaction. *J Pathol* 162, 191-196.
- Grawunder, U., Harfst, E., 2001. How to make ends meet in V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* 13, 186-194.
- Hardy, W.D., Jr., 1981. Haematopoietic tumors of cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 17, 921-940.
- Hardy, W.D., Jr., McClelland, A.J., Zuckerman, E.E., Snyder, H.W., Jr., MacEwen, E.G., Francis, D., Essex, M., 1980. Development of virus non-producer lymphosarcomas in pet cats exposed to FeLV. *Nature* 288, 90-92.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C., et al., 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392.
- Helling, R.B., Goodman, H.M., Boyer, H.W., 1974. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 14, 1235-1244.
- Hiom, K., Gellert, M., 1998. Assembly of a 12/23 paired signal complex: a critical control point in V(D)J recombination. *Mol Cell* 1, 1011-1019.
- Hoeve, M.A., Krol, A.D.G., Philippo, K., Derksen, P.W.B., Veenendaal, R.A., Schuurin, E., Kluin, P.M., van Krieken, J.H.J.M., 2000. Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. *J Clin Pathol-Mol Path* 53, 194-200.

- Hutson, C.A., Rideout, B.A., Pedersen, N.C., 1991. Neoplasia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats of southern California. *J Am Vet Med Assoc* 199, 1357-1362.
- Inghirami, G., Szabolcs, M.J., Yee, H.T., Corradini, P., Cesarman, E., Knowles, D.M., 1993. Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B cell non-Hodgkin's lymphomas and leukemias in fresh, unfixed and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction. *Lab Invest* 68, 746-757.
- Izzo, V., Costa, M.A., Di Fiore, R., Duro, G., Bellavia, D., Cascone, E., Colombo, P., Gioviale, M.C., Barbieri, R., 2006. Electrophoresis of proteins and DNA on horizontal sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Immun Ageing* 3, 7.
- Jackson, M.L., Wood, S.L., Misra, V., Haines, D.M., 1996. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. *Can J Vet Res* 60, 199-204.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D., 1999. *Immuno Biology: The immune system in health and disease*, 4. Edition. Elsevier.
- Jarrett, W.F., Mackey, L.J., 1974. Neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues. *Bull World Health Organ* 50, 21-34.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 76-79.
- Jumaa, H., Hendriks, R.W., Reth, M., 2005. B cell signaling and tumorigenesis. *Annu Rev Immunol* 23, 415-445.
- Jung, D., Alt, F.W., 2004. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116, 299-311.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 24, 541-570.
- Kabat, E., Wu, T., Bilofsky, H., 1979. Evidence supporting somatic assembly of the DNA segments (minigenes), coding for the framework, and complementarity-determining segments of immunoglobulin variable regions. *J Exp Med* 149, 1299-1313.
- Kipar, A., Bellmann, S., Kremendahl, J., Kohler, K., Reinacher, M., 1998. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 65, 243-257.
- Klotz, F., Gathings, W., Cooper, M., 1985. Development and distribution of B lineage cells in the domestic cat: analysis with monoclonal antibodies to cat mu-, gamma-, kappa-, and lambda-chains and heterologous anti-alpha antibodies. *J Immunol* 134, 95-100.
- Knudson, A.G., Jr., 1985. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45, 1437-1443.
- Köhler, K., 2003. Untersuchungen zur Klassifikation maligner Lymphome sowie zur differentiellen Expression von Virusproteinen bei FeLV-positiven malignen Lymphomen der Katze. *Diss Vet Med. Justus-Liebig-Universität, Giessen*.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., Alt, F.W., 1993. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 261, 1171-1175.
- Kreuzer, R., 2005. Charakterisierung des genetischen Defektes der GM1-Gangliosidose beim Alaskan Husky. *Diss Vet Med. Justus-Liebig-Universität, Giessen*.
- Lane, P., McConnell, F., Schieven, G., Clark, E., Ledbetter, J., 1990. The role of class II molecules in human B cell activation. Association with phosphatidyl inositol turnover, protein tyrosine phosphorylation, and proliferation. *J Immunol* 144, 3684-3692.
- Lefranc, M.P., 2001. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp Clin Immunogenet* 18, 100-116.

- Lefranc, M.P., Giudicelli, V., Busin, C., Bodmer, J., Muller, W., Bontrop, R., Lemaitre, M., Malik, A., Chaume, D., 1998. IMGT, the International ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 26, 297-303.
- Lennox, E.S., Cohn, M., 1967. Immunoglobulins. *Annu Rev Biochem* 36, 365-406.
- Levy, R., Warnke, R., Dorfman, R., Haimovich, J., 1977. The monoclonality of human B-cell lymphomas. *J Exp Med* 145, 1014-1028.
- Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G.W., Kaschka-Dierich, C., Jehn, U., 1976. Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol* 102, 511-530.
- Link, M., Hirschberger, J., 2000. Felines malignes Lymphom: Ergebnisse der Chemotherapie und prognostische Faktoren. *Tierärztl. Prax.* 28 (K), 87 – 93.
- Lorenzen, J., Hansmann, M.-L., R., F., 1994. Klonalitätsnachweis bei lymphoproliferativen Erkrankungen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion. *Pathologe* 15, 96 – 102.
- Louwerens, M., London, C.A., Pedersen, N.C., Lyons, L.A., 2005. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med* 19, 329-335.
- Lu, M., Kawamoto, H., Katsube, Y., Ikawa, T., Katsura, Y., 2002. The common myelolymphoid progenitor: a key intermediate stage in hemopoiesis generating T and B cells. *J Immunol* 169, 3519-3525.
- Lyon, M.F., 1988. The William Allan memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. *Am J Hum Genet* 42, 8-16.
- Maizels, N., 1995. Somatic hypermutation: How many mechanisms diversify V region sequences? *Cell* 83, 9-12.
- Martini, G., Toniolo, D., Vulliamy, T., Luzzatto, L., Dono, R., Viglietto, G., Paonessa, G., D'Urso, M., Persico, M.G., 1986. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Embo J* 5, 1849-1855.
- Mastache, E.F., Lindroth, K., Fernandez, C., Gonzalez-Fernandez, A., 2006. Somatic Hypermutation of Ig Genes is Affected Differently by Failures in Apoptosis Caused by Disruption of Fas (lpr Mutation) or by Overexpression of Bcl-2. *Scand J Immunol* 63, 420-429.
- Matsuo, T., Nomura, J., Kuwahara, K., Igarashi, H., Inui, S., Hamaguchi, M., Kimoto, M., Sakaguchi, N., 1993. Cross-linking of B cell receptor-related MB-1 molecule induces protein tyrosine phosphorylation in early B lineage cells. *J Immunol* 150, 3766-3775.
- Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L., Chenchik, A., 1999. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucl Acids Res* 27, 1558-1560.
- Max, E.E., Seidman, J.G., Leder, P., 1979. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 3450-3454.
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., Oettinger, M.A., 1995. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387-395.
- McCarthy, K., Sloane, J., Kabarowski, J., Matutes, E., Wiedemann, L., 1991. The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol* 138, 821-828.
- McCarthy, K.P., 1997. Molecular diagnosis of lymphomas and associated diseases. *Cancer Metastasis Rev* 16, 109-125.
- McCarthy, K.P., Sloane, J.P., Wiedemann, L.M., 1990. Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell populations in surgical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 43, 429-432.
- Medeiros, L.J., Carr, J., 1999. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 123, 1189-1207.

- Melnyk, A., Rodriguez, A., Pugh, W.C., Cabannillas, F., 1997. Evaluation of the Revised European-American Lymphoma classification confirms the clinical relevance of immunophenotype in 560 cases of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89, 4514-4520.
- Menotti-Raymond, M.A., David, V.A., Wachter, L.L., Butler, J.M., O'Brien, S.J., 2005. An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *J Forensic Sci* 50, 1061-1070.
- Mitelman, F., Johansson, B., Mertens, F.E., 2006. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Momoi, Y., Nagase, M., Okamoto, Y., Okuda, M., Sasaki, N., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., 1993. Rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in canine lymphoma/leukemia cells. *J Vet Med Sci* 55, 775-780.
- Mooney, S.C., Patnaik, A.K., Hayes, A.A., MacEwen, E.G., 1987. Generalized lymphadenopathy resembling lymphoma in cats: six cases (1972-1976). *J Am Vet Med Assoc* 190, 897-900.
- Moore, P.F., Woo, J.C., Vernau, W., Kosten, S., Graham, P.S., 2005. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 167-178.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Murphy, F.A., Gibbs, E., Horzinek, M.C., Studdert, M., 1999. *Veterinary virology*, 3 Edition. Academic Press.
- Neil, J.C., Forrest, D., Doggett, D.L., Mullins, J.I., 1987. The role of feline leukaemia virus in naturally occurring leukaemias. *Cancer Surv* 6, 117-137.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., Baltimore, D., 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523.
- Patterson-Kane, J.C., Kugler, B.P., Francis, K., 2004. The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. *J Comp Pathol* 130, 220-222.
- Pedersen, N.C., Barlough, J.E., 1991. Clinical overview of feline immunodeficiency virus. *J Am Vet Med Assoc* 199, 1298-1305.
- Raab-Traub, N., Flynn, K., 1986. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 47, 883-889.
- Rabbitts, T.H., 1978. Evidence for splicing of interrupted immunoglobulin variable and constant region sequences in nuclear RNA. *Nature* 275, 291-296.
- Ramasamy, I., Brisco, M., Morley, A., 1992. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J Clin Pathol* 45, 770-775.
- Rast, J.P., Litman, G.W., 1994. T-cell receptor gene homologs are present in the most primitive jawed vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9248-9252.
- Reichard, K.K., McKenna, R.W., Kroft, S.H., 2003. Comparative analysis of light chain expression in germinal center cells and mantle cells of reactive lymphoid tissues. A four-color flow cytometric study. *Am J Clin Pathol* 119, 130-136.
- Reinacher, M., 1997. Praxisrelevante Tumoren bei der Katze. *Prakt. Tierarzt, coll. vet.* XXVII, 10 - 12.
- Reinacher, M., Theilen, G., 1987. Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *Am J Vet Res* 48, 939-945.

- Reinacher, M., Wittmer, G., Koberstein, H., Failing, K., 1995. Untersuchungen zur Bedeutung der FeLV-Infektion für Erkrankungen bei Sektionskatzen. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 108, 58 - 60.
- Reth, M., 1992. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10, 97-121.
- Rezuke, W.N., Abernathy, E.C., Tsongalis, G.J., 1997. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clin Chem* 43, 1814-1823.
- Rohn, J.L., Overbaugh, J., 1995. In vivo selection of long terminal repeat alterations in feline leukemia virus-induced thymic lymphomas. *Virology* 206, 661-665.
- Roth, D.B., Menetski, J.P., Nakajima, P.B., Bosma, M.J., Gellert, M., 1992. V(D)J recombination: broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes. *Cell* 70, 983-991.
- Roth, D.B., Zhu, C., Gellert, M., 1993. Characterization of broken DNA molecules associated with V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10788-10792.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., Tonegawa, S., 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 280, 288-294.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., Baltimore, D., 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.
- Schiffer, M., Girling, R.L., Ely, K.R., Edmundson, A.B., 1973. Structure of a lambda-type Bence-Jones protein at 3.5-Å resolution. *Biochemistry* 12, 4620-4631.
- Schlissel, M., Constantinescu, A., Morrow, T., Baxter, M., Peng, A., 1993. Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev* 7, 2520-2532.
- Schmidt, V., Horzinek, M.C., (Hrsg), 1992. *Krankheiten der Katze*. Bd. 1, Gustav Fischer Verlag.
- Secker-Walker, L.M., 1985. The meaning of a clone. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 16, 187-188.
- Segal, G.H., Jorgensen, T., Masih, A.S., Braylan, R.C., 1994a. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: I. Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type. *Hum Pathol* 25, 1269-1275.
- Segal, G.H., Jorgensen, T., Scott, M., Braylan, R.C., 1994b. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: II. Follicular lymphomas. *Hum Pathol* 25, 1276-1282.
- Segal, G.H., Wittwer, C.T., Fishleder, A.J., Stoler, M.H., Tubbs, R.R., Kjeldsberg, C.R., 1992. Identification of monoclonal B-cell populations by rapid cycle polymerase chain reaction. A practical screening method for the detection of immunoglobulin gene rearrangements. *Am J Pathol* 141, 1291-1297.
- Seide, R.K., Kehoe, J.M., 1983. The genetic control of antibody formation. *Vet Immunol Immunopathol* 4, 3-42.
- Seidman, J.G., Leder, A., Edgell, M.H., Polsky, F., Tilghman, S.M., Tiemeier, D.C., Leder, P., 1978. Multiple related immunoglobulin variable-region genes identified by cloning and sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 3881-3885.
- Serth, J., Kuczyk, M.A., Paeslack, U., Lichtinghagen, R., Jonas, U., 2000. Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *Am J Pathol* 156, 1189-1196.

- Shapiro, G.S., Aviszus, K., Ikle, D., Wysocki, L.J., 1999. Predicting regional mutability in antibody V genes based solely on di- and trinucleotide sequence composition. *J Immunol* 163, 259-268.
- Shaw, S.E., Robertson, I.D., Robinson, W.F., Alexander, R., Sutherland, R.J., 1990. Feline immunodeficiency virus: disease associations. *Aust Vet Practit* 20, 194 – 198.
- Sherding, R.G., 1994. *The Cat: Diseases and Clinical Management*, Vol 1, 2nd Edition. Churchill Livingstone.
- Shi, S.-R., Datar, R., Liu, C., Wu, L., Zhang, Z., Cote, R.J., Taylor, C.R., 2004. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biol* 122, 211-218.
- Shigehiko Ishihara, S.O., Hiroshi Wakiguchi, Takanobu Kurashige, Kanji Hirai, Keisei Kawa-Ha., 1997. Clonal lymphoproliferation following chronic active Epstein-Barr virus infection and hypersensitivity to mosquito bites. *Am J Hematol* 54, 276-281.
- Signoretti, S., Murphy, M., Cangi, M.G., Puddu, P., Kadin, M.E., Loda, M., 1999. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction and nonradioactive single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 154, 67-75.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S., 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161, 1961-1971.
- Szczepanski, T., Willemse, M.J., van Wering, E.R., van Weerden, J.F., Kamps, W.A., van Dongen, J.J., 2001. Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 15, 1415-1423.
- Takemoto, S., Matsuoka, M., Yamaguchi, K., Takatsuki, K., 1994. A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction. *Blood* 84, 3080-3085.
- Terry, A., Callanan, J.J., Fulton, R., Jarrett, O., Neil, J.C., 1995. Molecular analysis of tumours from feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: an indirect role for FIV? *Int J Cancer* 61, 227-232.
- Tizard, I.R., 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction*, 7 Edition. Saunders.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Tonegawa, S., Maxam, A.M., Tizard, R., Bernard, O., Gilbert, W., 1978. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 1485-1489.
- Trainor, K.J., Brisco, M.J., Story, C.J., Morley, A.A., 1990. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 75, 2220-2222.
- Vail, D.M., Moore, A.S., Ogilvie, G.K., Volk, L.M., 1998. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med* 12, 349-354.
- Valli, V.E., Jacobs, R.M., Norris, A., Couto, C.G., Morrison, W.B., McCaw, D., Cotter, S., Ogilvie, G., Moore, A., 2000. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Invest* 12, 295-306.
- Valli, V.E., Jacobs, R.M., Parodi, A.L., Vernau, W., Moore, P.F., 2002. *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals: Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals.*, Vol VIII. Armed Force Institut of Pathology, American Registry of Pathology.

- Valli, V.E., McSherry, B.J., Dunham, B.M., Jacobs, R.M., Lumsden, J.H., 1981. Histocytology of lymphoid tumors in the dog, cat and cow. *Vet Pathol* 18, 494-512.
- van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Bruggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurings, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J.H., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M., Macintyre, E.A., 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17, 2257-2317.
- van Gent, D.C., McBlane, J.F., Ramsden, D.A., Sadofsky, M.J., Hesse, J.E., Gellert, M., 1995. Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system. *Cell* 81, 925-934.
- Varmus, H., 1988. Retroviruses. *Science* 240, 1427-1435.
- Vernau, W., Moore, P.F., 1999. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 69, 145-164.
- Wainscoat, J.S., Fey, M.F., 1990. Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Res* 50, 1355-1360.
- Waldmann, T.A., 1987. The arrangement of immunoglobulin and T-cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv Immunol* 40, 247 – 321.
- Wall, R., Kuehl, M., 1983. Biosynthesis and Regulation of Immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 1, 393-422.
- Walling, D.M., Andritsos, L.A., Etienne, W., Payne, D.A., Aronson, J.F., Flaitz, C.M., Nichols, C.M., 2004. Molecular markers of clonality and identity in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disease. *J Med Virol* 74, 94-101.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506-513.
- Wan, J.H., Trainor, K.J., Brisco, M.J., Morley, A.A., 1990. Monoclonality in B cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 43, 888-890.
- Wang, J., Kyaw-Tanner, M., Lee, C., Robinson, W.F., 2001. Characterisation of lymphosarcomas in Australian cats using polymerase chain reaction and immunohistochemical examination. *Aust Vet J* 79, 41-46.
- Weiss, A., 2007. Untersuchungen zur Klassifikation maligner Lymphome sowie zur differentiellen Expression von Virusproteinen bei FeLV-positiven malignen Lymphomen der Katze. *Diss Vet Med. Justus-Liebig-Universität, Giessen*.
- Werner, J.A., Woo, J.C., Vernau, W., Graham, P.S., Grahn, R.A., Lyons, L.A., Moore, P.F., 2005. Characterization of Feline Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes for the Molecular Diagnosis of B-cell Neoplasia. *Vet Pathol* 42, 596-607.
- Williamson, A.R., 1976. The Biological Origin of Antibody Diversity. *Annu Rev Biochem* 45, 467-500.
- Wu, F.-Y., Iijima, K., Tsujimoto, H., Tamura, Y., Higurashi, M., 1995. Chromosomal translocations in two feline T-cell lymphomas. *Leuk Res* 19, 857-860.
- Wu, T.T., Kabat, E.A., 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132, 211-250.
- Wu, T.T., Kabat, E.A., Bilofsky, H., 1979. Some sequence similarities among cloned mouse DNA segments that code for lambda and kappa light chains of immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4617-4621.

8 Anhang

8.1 Verwendete Längenstandards

8.1.1 pUC19/MspI

Für die Herstellung des DNS-Längenstandards pUC19/*MspI* wurde ein zirkuläres Plasmid des Typs pUC19 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) den Angaben des Herstellers folgend in Library Efficiency[®] DH5 α TM Cells (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. Diese wurden über Nacht auf Agarplatten angezüchtet.

Eine blaue Kolonie wurde nach Überführung in 100 ml LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert.

Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit dem NucleoSpin[®] Plasmid Kit isoliert (s. 3.7.7) und aufgereinigt. Aus der Plasmid-DNS-Lösung konnte die DNS mit einem Zehntel Volumen Natriumacetat und dem gleichen Volumen 100%igem Isopropanol gefällt werden. Die Rehydrierung des so entstandenen und luftgetrockneten Pellets erfolgte mit einer der Größe des Pellets angemessenen Menge 0,5 \times Tris-Puffer (Zugabe von Puffer bis zur Lösung des Pellets). Nach der photometrischen Bestimmung der DNS-Konzentration wurde

das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease *MspI* (Fermentas, St. Leon-Rot) unter Standardbedingungen gespalten. Nach Deaktivieren des Enzyms durch Inkubation für 20 Minuten bei 65 °C wurde der Ansatz mit 0,5 \times Tris-Puffer (s. 8.15.2.3) auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l eingestellt und mit der unter 8.15.2.4 beschriebenen Lösung zum Laden der Gelaschen unter Verwendung von Xylenzyanol als Farbstoff versetzt.

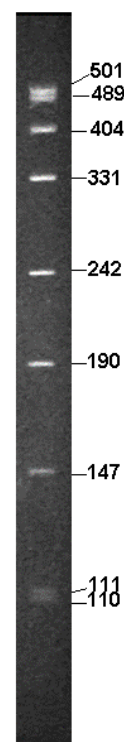


Abbildung 40:

pUC19/*MspI* mit Angabe der Länge der verschiedenen Banden in Basenpaaren.

8.1.2 MF

Der Längenstandard MF beruht auf dem Plasmid pCR2.1 aus dem TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Karlsruhe). Die entstehenden Fragmentgrößen wurden anhand der durch den Hersteller angegebenen Sequenz mit dem Programm DNAsis 6.00 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, USA) bestimmt. Das Plasmid wurde nach Herstellerangaben in die effizienten DH5 α Zellen des Kits transformiert. Anzucht und Plasmidisolation erfolgten wie unter 3.7.7 angegeben. Von dem isolierten Plasmid wurden 60 % mit der Restriktionsendonuklease *Hinf*I und 40 % mit *Rsa*I unter Standardbedingungen verdaut. Nach Deaktivieren der Enzyme durch Inkubation für 20 Minuten bei 65 °C erfolgte die Vermischung beider Ansätze untereinander und mit der unter 8.15.2.4 beschriebenen Lösung zum Laden der Geltaschen unter Verwendung von Bromphenolblau als Farbstoff.

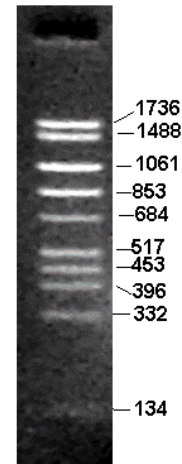
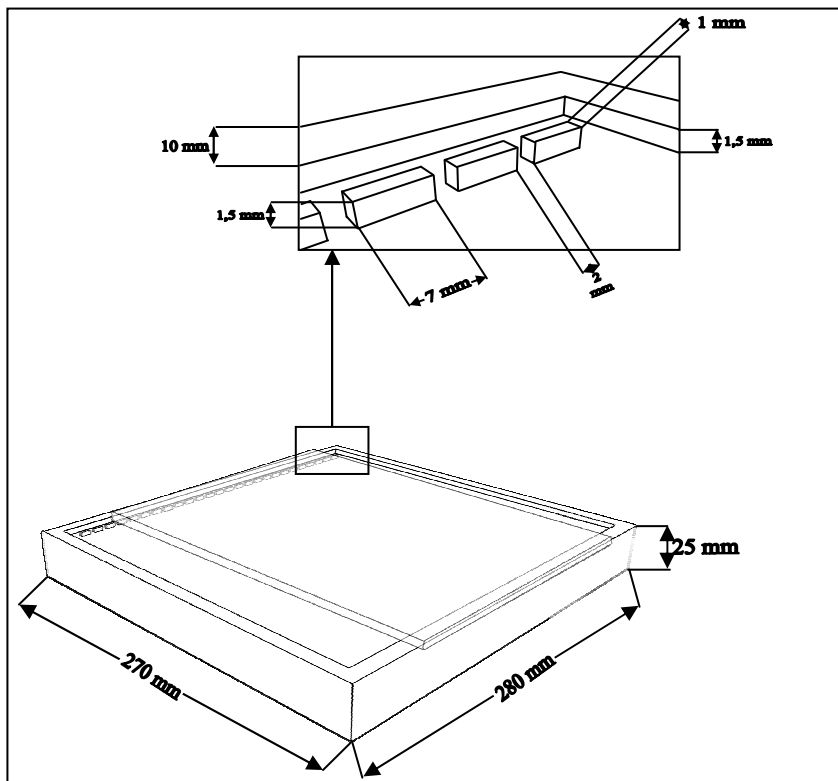


Abbildung 41:

Längenstandard MF mit Angabe der Länge der einzelnen Banden in Basenpaaren.

8.2 Gießblock für die horizontale SDS-PAGE

Abbildung 42: Schemazeichnung des Gießblockes für die horizontale SDS-PAGE



8.3 Tagebuchnummern, Art der Fixierung und DNS-Isolierung

FFPE: Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe

Amp: Amplifikation

(Amp): Schwache Amplifikation

kAmp: Keine Amplifikation

n.d.: Nicht durchgeführt

Tabelle 59: Isolierte DNS-Proben

Tagebuch-nummer	Art der Fixierung	Isolierungsmethode	300 bp amplifizierbar	100 bp amplifizierbar
B-Zell-Lymphome				
380/89	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	kAmp
2071/89	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	kAmp
1895/90	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
2802/92	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	Amp
2847/92	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
3020/92	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
2137/92	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
512/93	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
1107/94	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	kAmp
1925/94	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
3166/94	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
1014/95	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	Amp
2047/95	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
817/97	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
940/97	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	(Amp)
1300/97	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
2253/97	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
2467/97	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
2655/97	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	kAmp
197/98	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex	Amp	n.d.*

Tabelle 59: Isolierte DNS-Proben (Fortsetzung)

Tagebuch- nummer	Art der Fixierung	Isolierungsmethode	300 bp amplifizierbar	100 bp amplifizierbar
		100/Chloroform		
1852/98	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
2130/99	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
1550/00	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	(Amp)
S1003/04	Frischmaterial	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
T383/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
T2415/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
T3429/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
T7795/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	(Amp)	n.d.*
S509/06	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	(Amp)
T1009/06	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
3597/06	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
T7192/06	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
T1528/07	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
Lymphatische Hyperplasien				
S1592/04	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	Amp
T273/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	Amp	n.d.*
S407/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
T630/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	Amp	n.d.*
T847/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	Amp	n.d.*
T878/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
S895/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	kAmp
S1033/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S1037/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S1132/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S1408/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S1412/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
T1600/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
T3171/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp

Tabelle 59: Isolierte DNS-Proben (Fortsetzung)

Tagebuch- nummer	Art der Fixierung	Isolierungsmethode	300 bp amplifizierbar	100 bp amplifizierbar
T3746/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	(Amp)	Amp
T5322/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	kAmp
T5391/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	kAmp
T6950/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	Amp	n.d.*
T7547/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	(Amp)
T7876/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
T8154/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
T8216/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
T8549/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
T8638/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
T8831/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
T8920/05	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
T7426/06	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
T7558/06	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S345/07	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
S348/07	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	Amp	n.d.*
T-Zell-Lymphome				
758/89	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	kAmp
1768/89	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	kAmp
1584/90	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	(Amp)	kAmp
1945/90	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
2155/90	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
280/92	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
1357/92	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
93/93	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
761/93	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
217/94	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	Amp	n.d.*
1883/94	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	Amp	n.d.*
835/95	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex	(Amp)	Amp

Tabelle 59: Isolierte DNS-Proben (Fortsetzung)

Tagebuch- nummer	Art der Fixierung	Isolierungsmethode	300 bp amplifizierbar	100 bp amplifizierbar
		100/Chloroform		
15/96	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	(Amp)	Amp
394/97	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
908/98	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
1989/98	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	(Amp)	Amp
358/99	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
1379/99	FFPE	Hitzebehandlung/Chelex 100/Chloroform	kAmp	Amp
S156/03	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S915/03	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S886/04	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S1205/04	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S1771/04	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	(Amp)
S1017/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	Amp
T3558/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	Amp
T4261/05	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
S372/06	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	kAmp
T781/07	FFPE	Puregene® DNA Purification Kit	kAmp	Amp

*eine Amplifikation des 100 bp-großen Fragmentes war nur notwendig, wenn die Amplifikation des 300 bp-großen Fragments mißlang.

8.4 Tagebuchnummern, Rasse, Alter und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe

(Proben aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig sind mit einem „L“ gekennzeichnet)

EKH: Europäisch Kurzhaar, BKH: Britisch Kurzhaar, w: weiblich, m: männlich, wk: weiblich-kastriert, mk: männlich-kastriert, Mo: Monate, k.a.: keine Angabe

Tabelle 60: Tagebuchnummer, Rasse, Alter (in Jahren, soweit nicht anders angegeben) und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe

Tagebuch-nummer	Rasse	Alter	Geschlecht	Lokalisation
B-Zell-Lymphome				
380/89 L	EKH	12	w	Darm
2071/89 L	k.a.	k.a.	k.a.	Darm
1895/90 L	EKH	10	m	Darm
2802/92 L	EKH	8	wk	Niere
2847/92 L	EKH	2	wk	Darm
3020/92 L	EKH	k.a.	w	Niere
2137/92 L	EKH	k.a.	w	Niere
512/93 L	EKH	ad.	w	Lymphknoten
1107/94 L	EKH	ad.	k.a.	Niere
1925/94 L	EKH	k.a.	k.a.	Thymus
3166/94 L	EKH	2	w	Lymphknoten
1014/95 L	EKH	6	w	Niere
2047/95 L	EKH	k.a.	k.a.	Darm
817/97 L	EKH	7	mk	Darm
1300/97 L	EKH	3	mk	Thymus
940/97 L	EKH	3	mk	Darm
2253/97 L	EKH	7	wk	Darm
2467/97 L	EKH	15	w	Niere
2655/97 L	EKH	adult	mk	Thymus
197/98 L	EKH/Perser	7	w	Darm
1852/98	EKH	3	wk	Lymphknoten
2130/99	EKH	19	mk	Darm
1550/00	EKH	16	mk	Thymus
S1003/04	Siam	13	m	Pankreas
T383/05	k.a.	14	wk	Niere
T2415/05	wk	ka	12a	Darm
T3429/05	k.a.	15	wk	Magen
T7795/05	ka	10	m	Auge
S509/06	EKH	14	wk	Lymphknoten
T1009/06	EKH	15	wk	Vordergliedmaße
T3597/06	EKH	16 Mo	k.a.	Niere
T7192/06	EKH	3	mk	Lymphknoten
T1528/07	EKH	3	m	Niere

Tabelle 60: Tagebuchnummer, Rasse, Alter (in Jahren, soweit nicht anders angegeben) und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe (Fortsetzung)

Tagebuchnummer	Rasse	Alter	Geschlecht	Lokalisation
Lymphatische Hyperplasien				
S1592/04	EKH	8	m	Milz
T273/05	BKH	3	mk	Lymphknoten
S408/05	EKH	5	mk	Lymphknoten
T630/05	EKH	2	k.a.	Lymphknoten
T847/05	EKH	14	mk	Lymphknoten
T878/05	EKH	15	wk	Lymphknoten
S895/05	Abessiner	4	mk	Milz
S1033/05	Türk. Angora	5	wk	Milz
S1037/05	EKH	1	wk	Lymphknoten
T1132/05	k.a.	3,5	m	Lymphknoten
S1408/05	EKH	3 Mo	w	Milz
S1412/05	Karhäuser	16 Mo	w	Milz
T1600/05	EKH	7 Mo	w	Milz
T3171/05	EKH	7 Mo	wk	Lymphknoten
T3746/05	EKH	1	w	Lymphknoten
T5322/05	Siam-Mix	12	wk	Lymphknoten
T5391/05	Maine-Coon	1	mk	Lymphknoten
T6950/05	EKH	2	mk	Lymphknoten
T7547/05	EKH	14	w	Milz
T7876/05	k.a.	8	m	Lymphknoten
T8154/05	EKH	8	mk	Lymphknoten
T8216/05	EKH	10	mk	Lymphknoten
T8549/05	EKH	12	w	Lymphknoten
T8638/05	EKH	1	m	Lymphknoten
T8831/05	EKH	1	w	Lymphknoten
T8920/05	EKH	11	mk	Lymphknoten
T7426/06	EKH	1	m	Lymphknoten
T7558/06	EKH	6 Mo	m	Lymphknoten
S345/07	BKH	9	wk	Milz
S348/07	k.a.	1	m	Milz
T-Zell-Lymphome				
758/89 L	EKH	8	m	Thymus
1768/89 L	Perser	5	mk	Thymus
1584/90 L	EKH	8	mk	Thymus
1945/90 L	Perser	5	mk	Niere
2155/90 L	EKH	12	mk	Darm
280/92 L	EKH	10	wk	Darm
1357/92 L	EKH	10	mk	Lymphknoten
93/93 L	EKH	13	mk	Darm
761/93 L	Siam	2	w	Thymus
217/94 L	EKH	0,75	w	Thymus
1883/94 L	EKH	adult	m	Darm
835/95 L	Perser	5	wk	Thymus
15/96 L	EKH	8 Mo	m	Darm
394/97 L	EKH	2	m	Thymus
908/98	EKH	3	mk	Thymus
1989/98	EKH	7,5	wk	Darm

Tabelle 60: Tagebuchnummer, Rasse, Alter (in Jahren, soweit nicht anders angegeben) und Geschlecht der für die DNS-Isolierung verwendeten Katzen sowie Lokalisation der Probe (Fortsetzung)

Tagebuch- nummer	Rasse	Alter	Geschlecht	Lokalisation
358/99	EKH	8 Mo	w	Lymphknoten
1379/99	EKH	15	wk	Darm
S156/03	EKH	5	wk	Thymus
S915/03	EKH	7	mk	Niere
S880/04	k.a.	k.a.	wk	Thymus
S1205/04	EKH	k.a.	w	Niere
S1771/04	EKH	1,5	w	Thymus
S1017/05	EKH	8	mk	Niere
T3558/05	k.a.	14	w	Flanke
T4261/05	EKH	9	mk	Lunge
S372/06	k.a.	1	m	Darm
T781/07	k.a.	11	wk	Nacken

8.5 Histologie der mit dem Diagnostiksystem untersuchten B-Zell-Lymphome

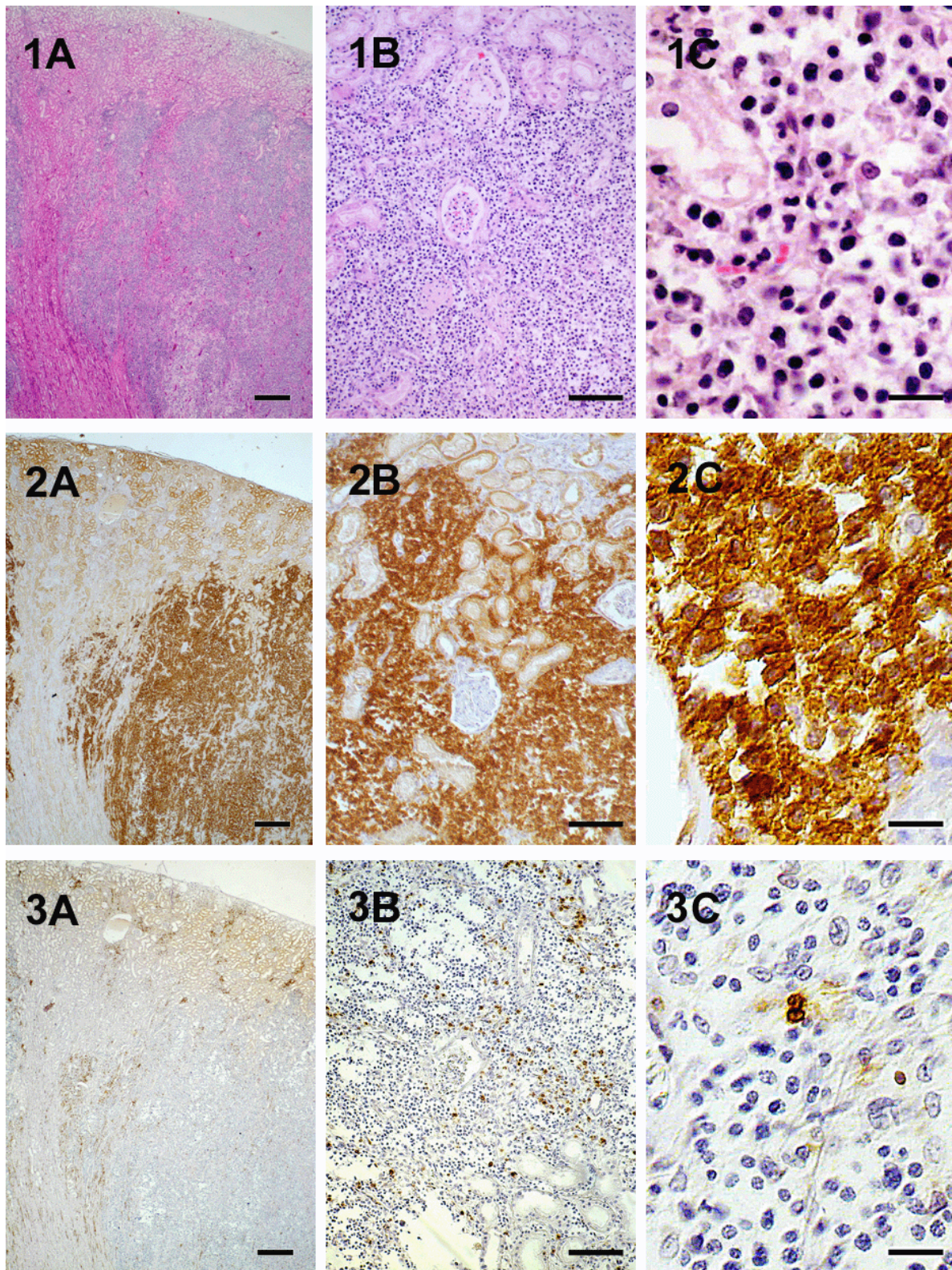


Abbildung 43: 3020/92

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

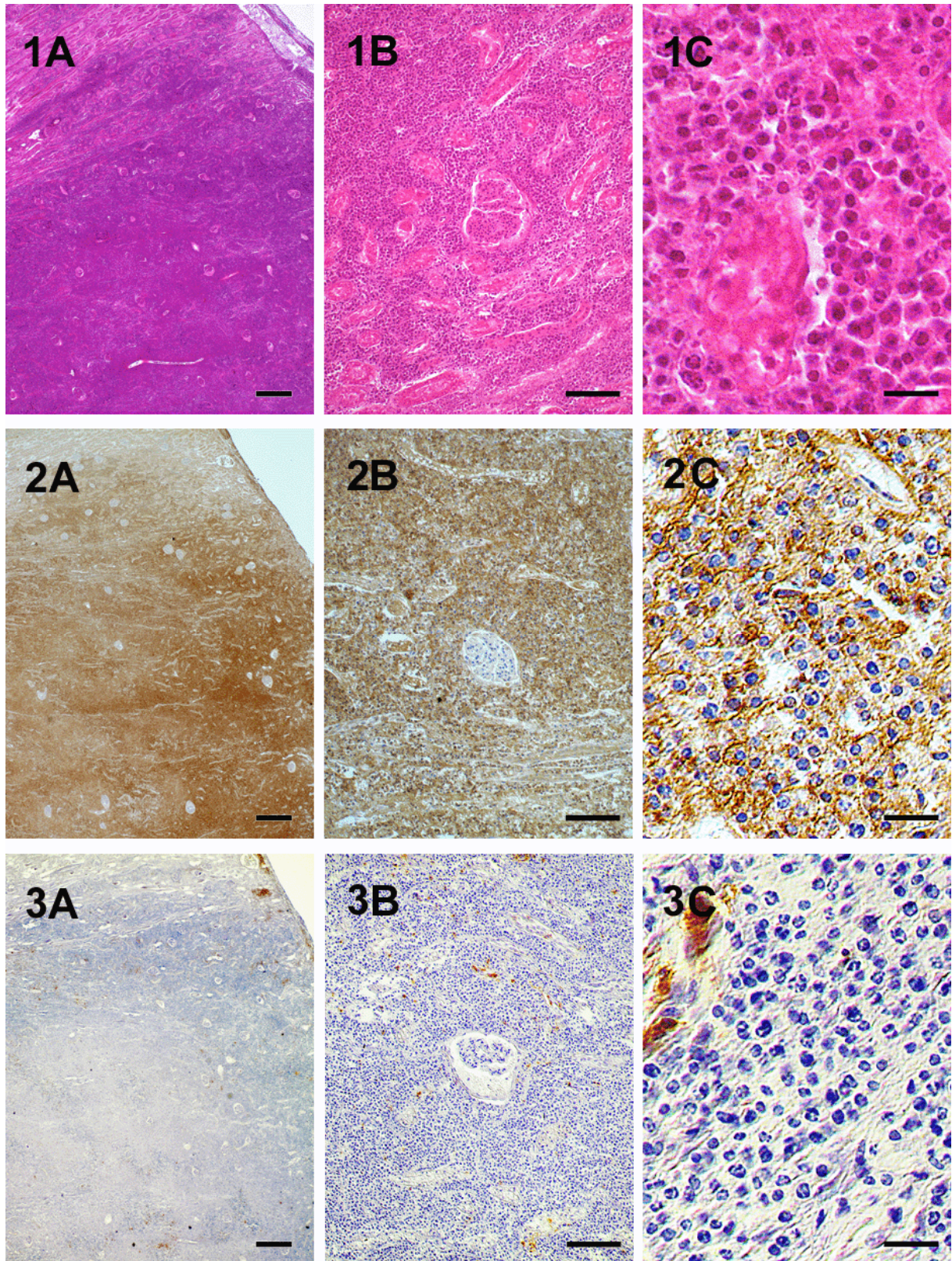


Abbildung 44: T3597/06

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

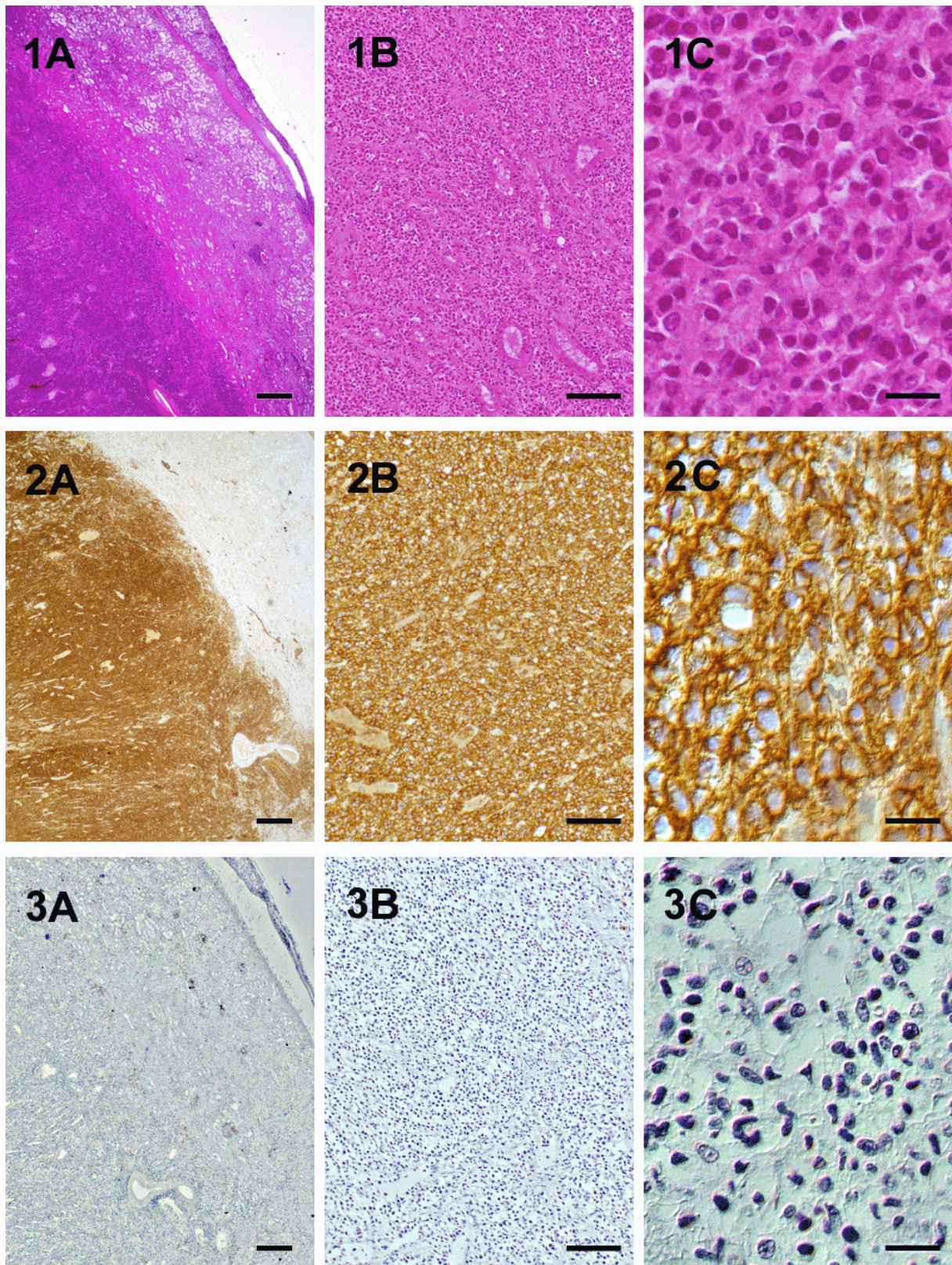


Abbildung 45: T383/05

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

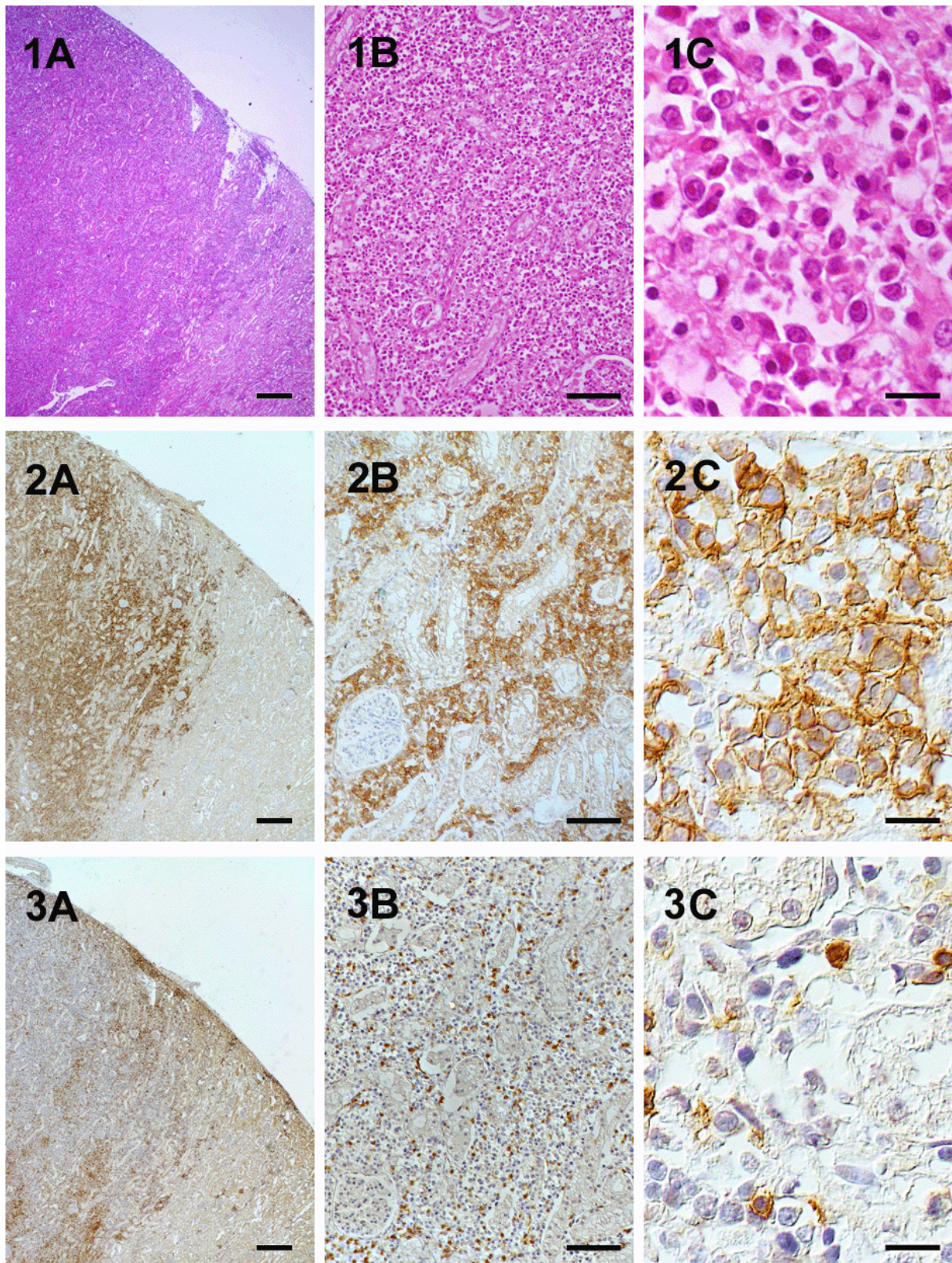


Abbildung 46: T1528/07

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

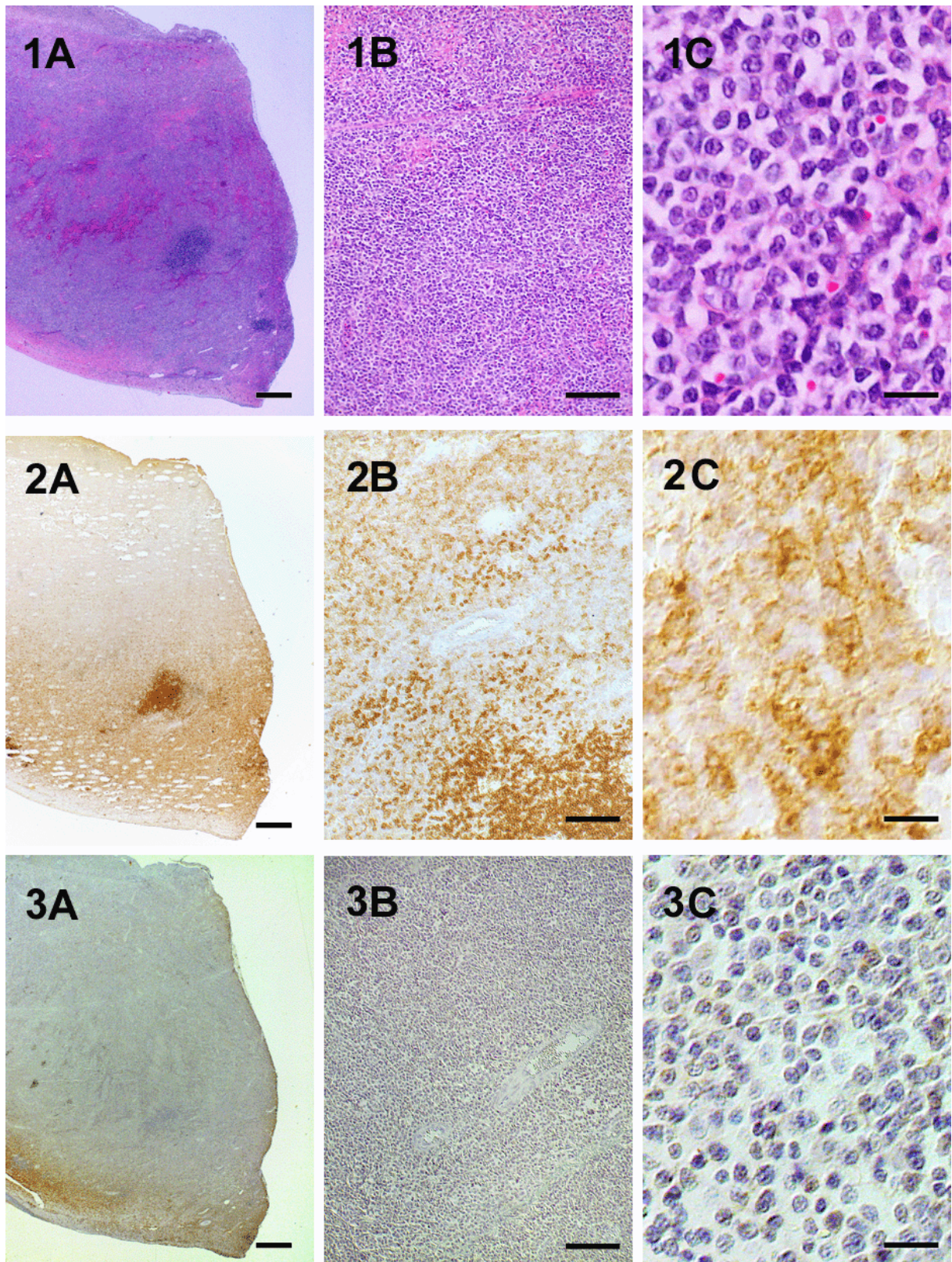


Abbildung 47: 2253/97

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

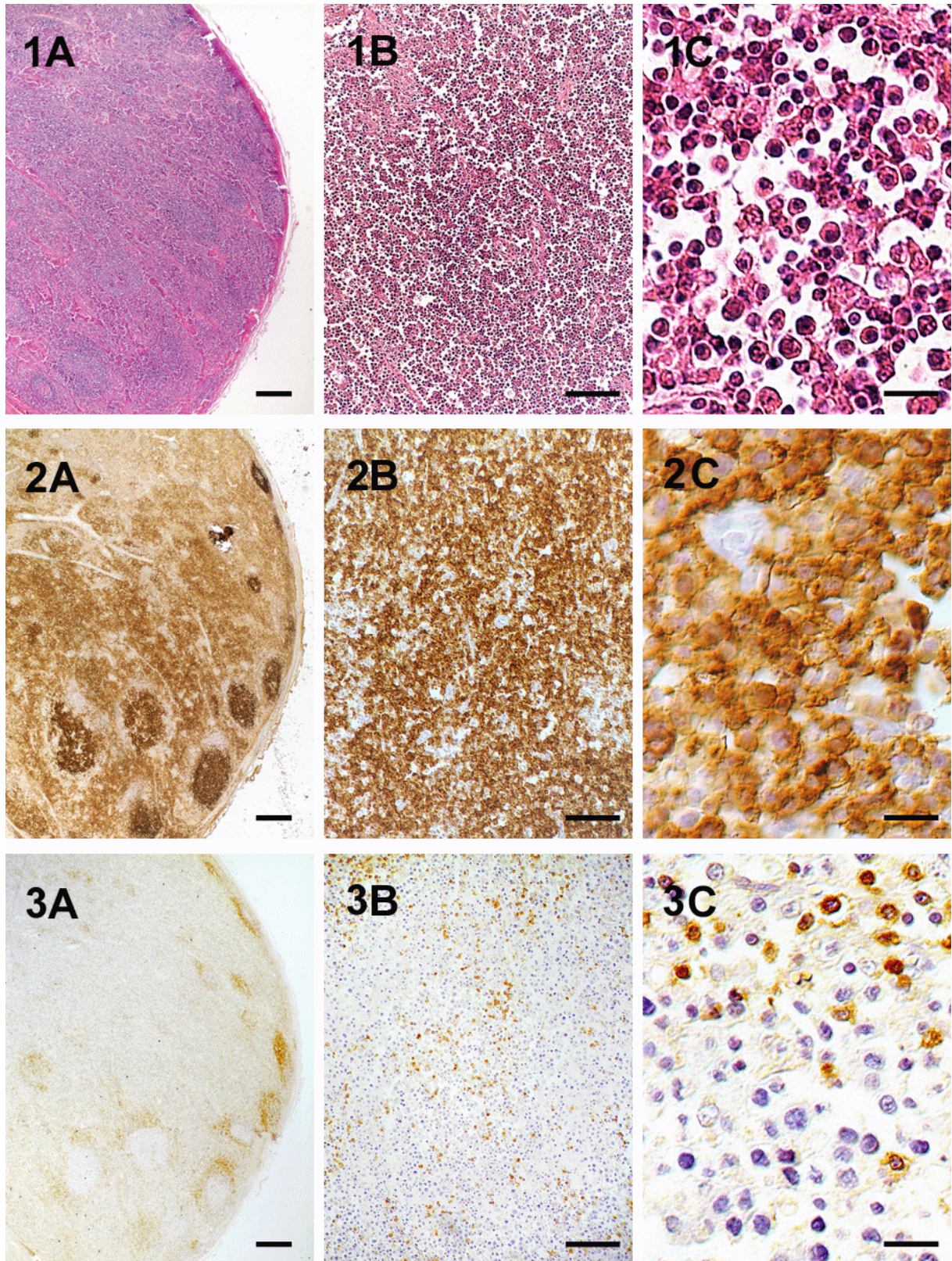


Abbildung 48: 2047/95

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

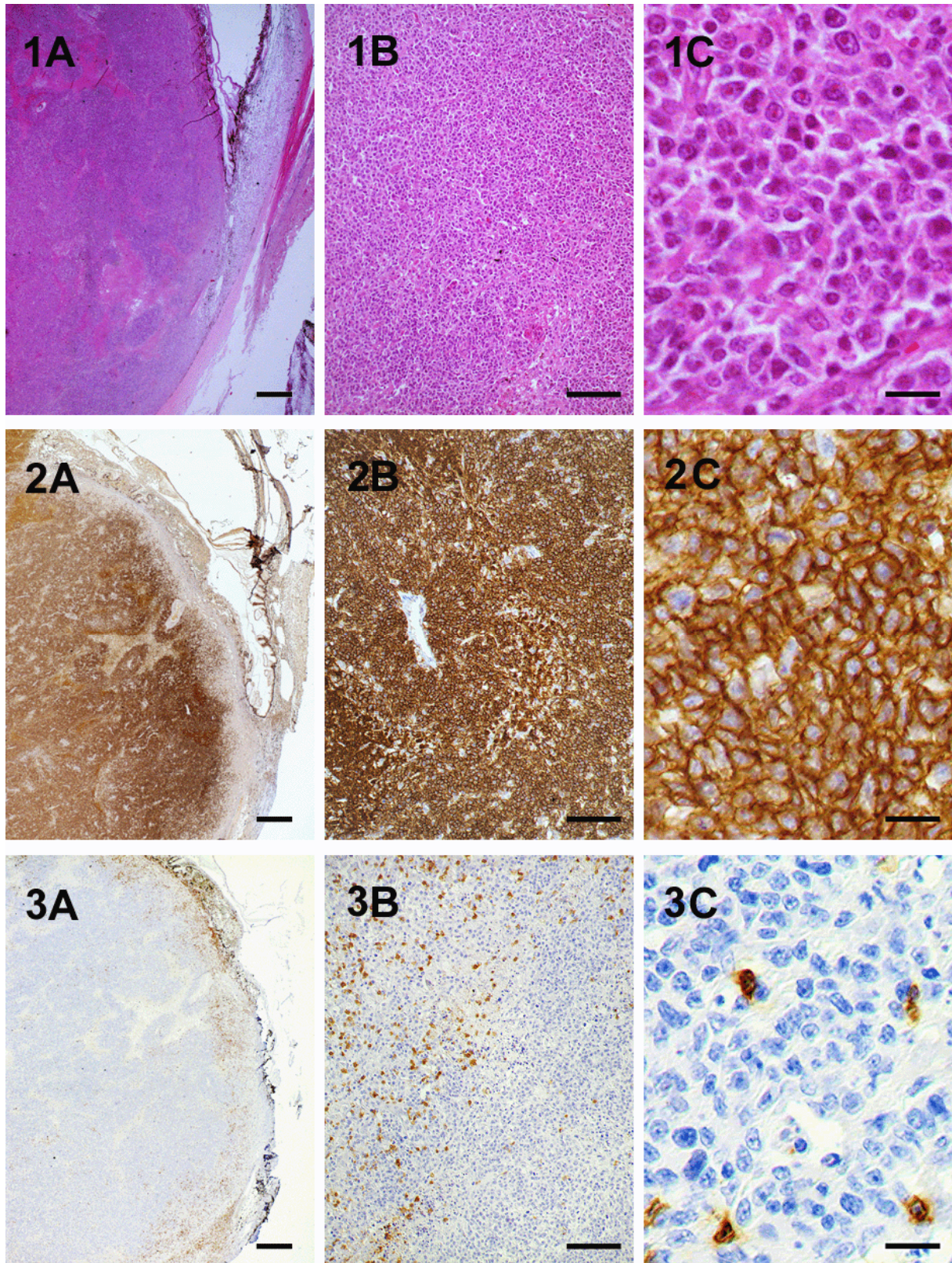


Abbildung 49: T7795/05

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

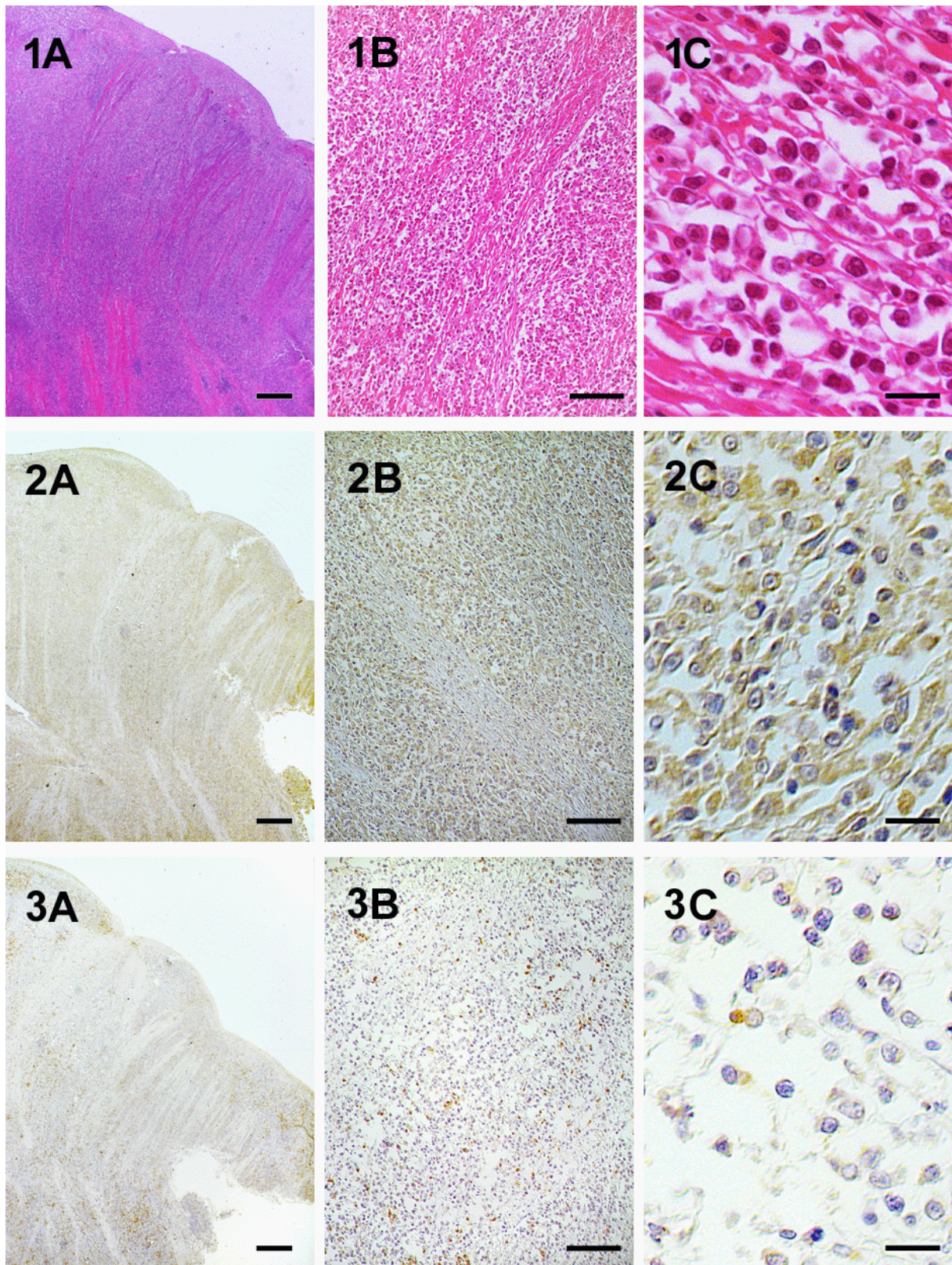


Abbildung 50: 940/97

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

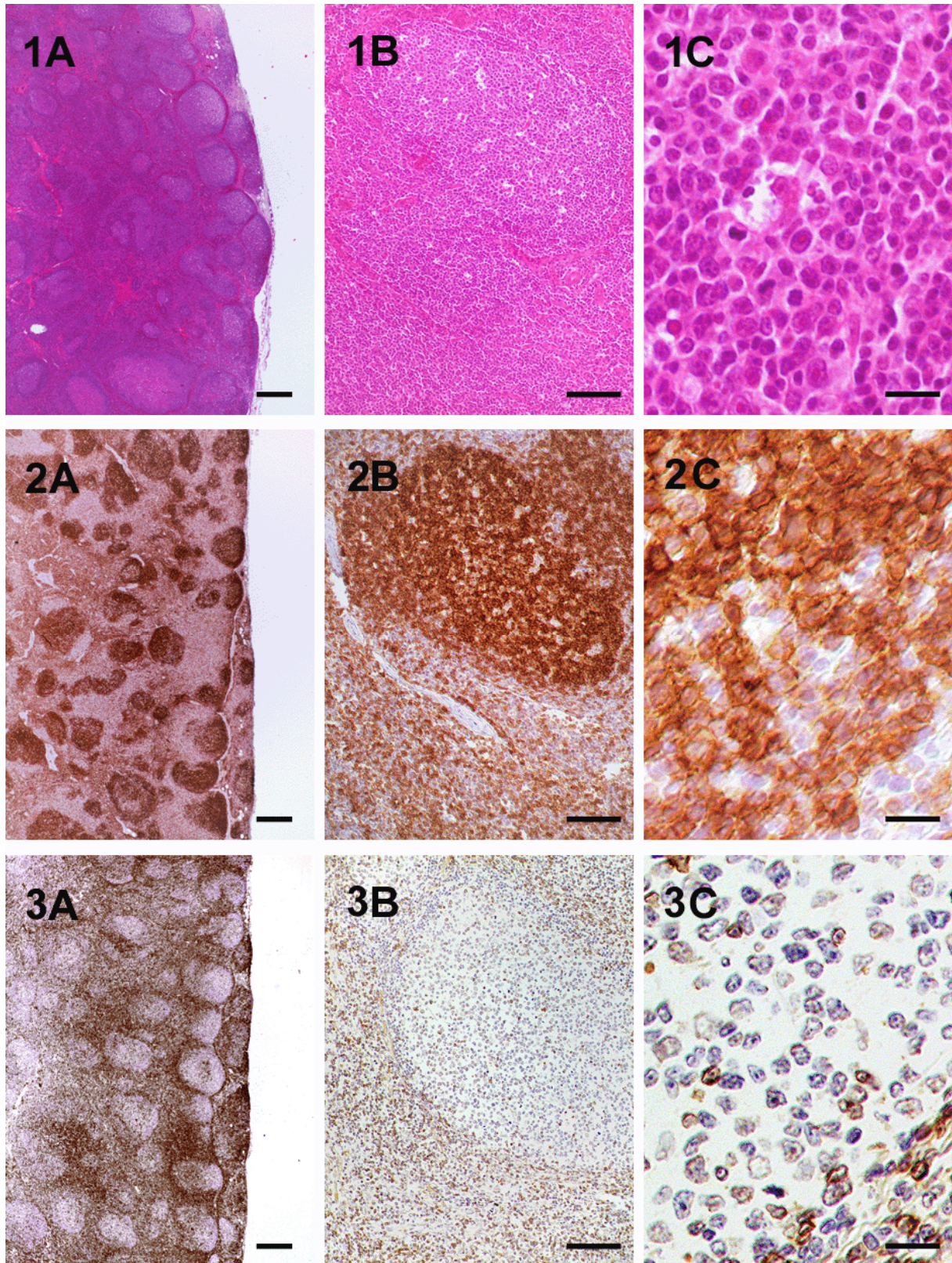


Abbildung 51: T7192/06

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

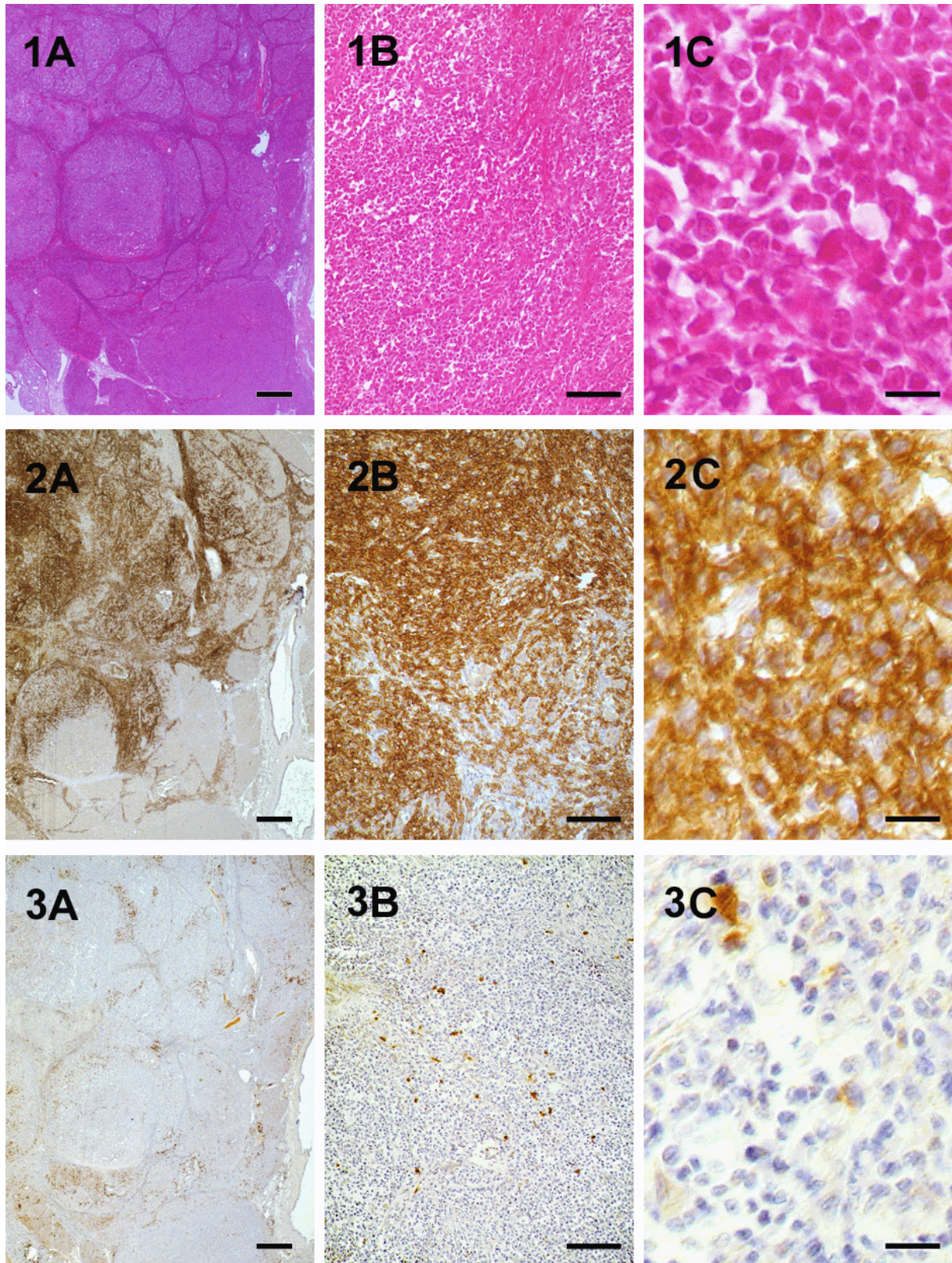


Abbildung 52: S1003/04

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

8.6 Histologie der Probe 1883/94 (T-Zell-Lymphom)

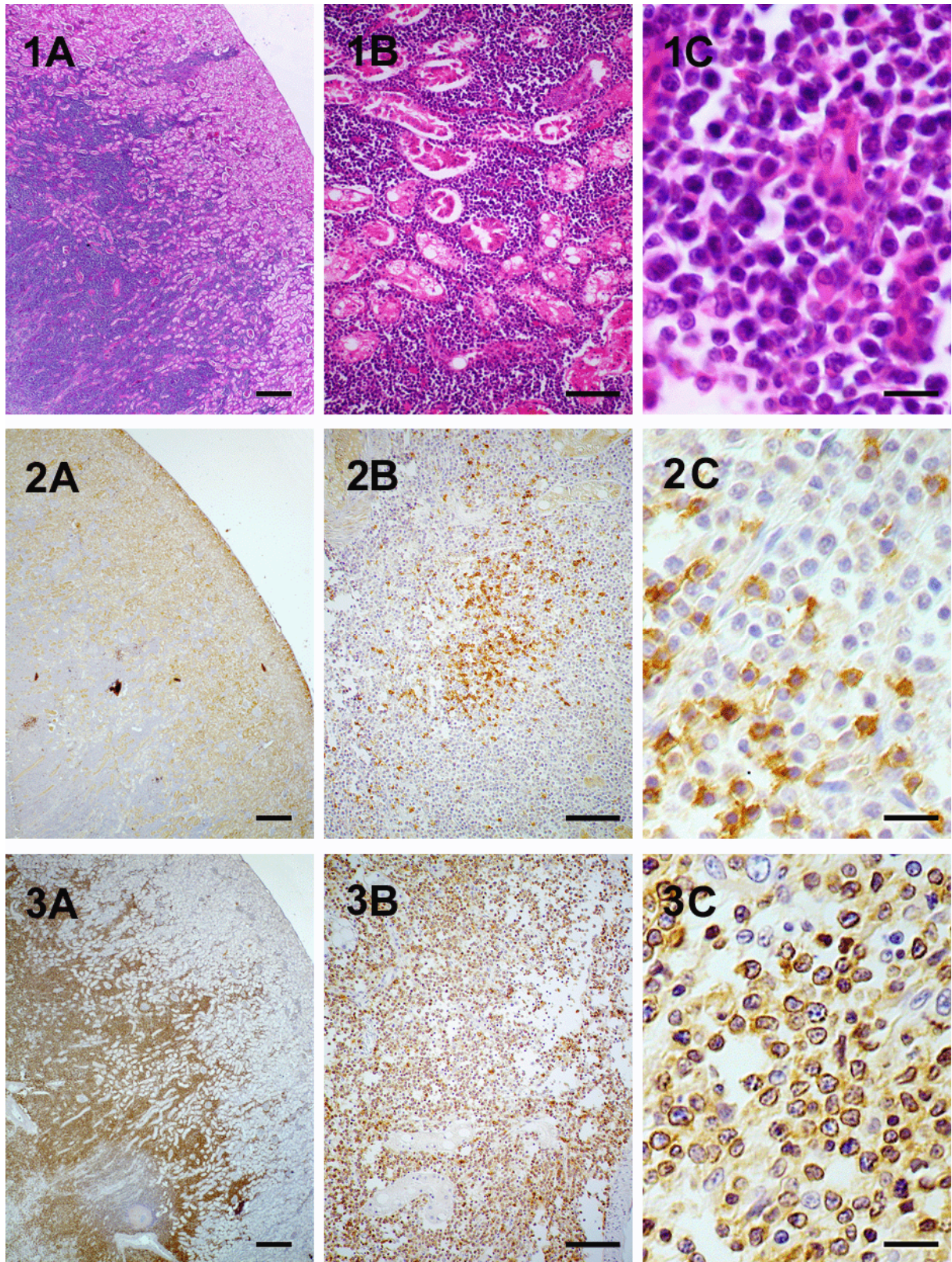


Abbildung 53: 1883/94

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

8.7 Histologie der Probe 878/05 (Lymphatische Hyperplasie)

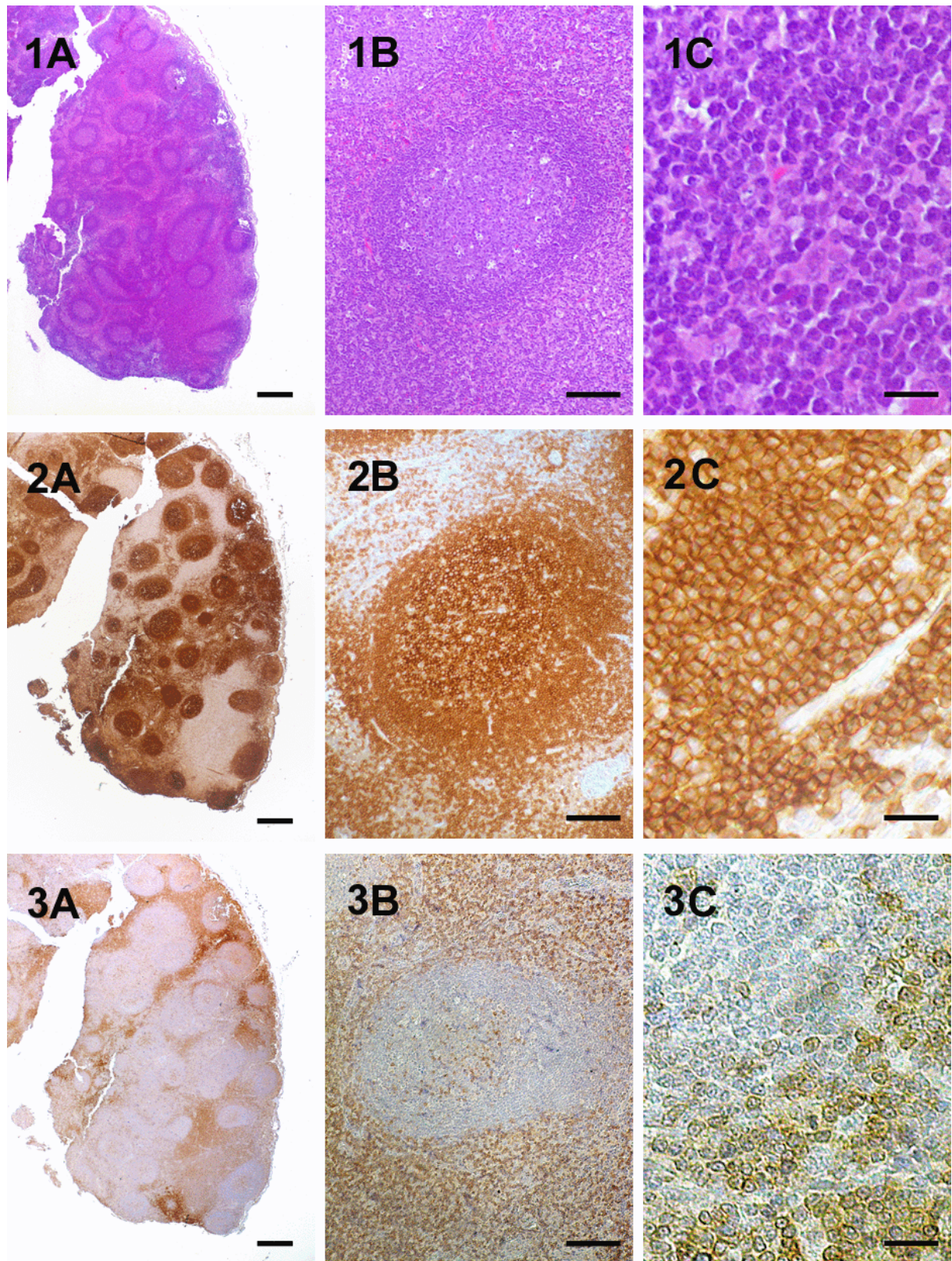


Abbildung 54: 878/05

Färbung: 1) HE 2) Immunhistologie gegen CD45R (B-Zellen) 3) Immunhistologie gegen CD3 (T-Zellen)

Vergrößerung: A) Übersicht (Balken = 500 µm) B) Mittlere Vergrößerung (Balken = 100 µm) C) Stark vergrößert (Balken = 33 µm)

8.8 Lokalisierung von Leaderregion, SMART II™ Oligonukleotid, V-Region, CDR3 und C-Region in den Inserts

Tabelle 61: Lokalisierung von Leaderregion, SMART II™ Oligonukleotid, V-Region, CDR3 und C-Region

Klon	Leader-region	SMART II™ Oligonukleotid	V-Region	CDR3	C-Region
R3.1	—	1-30	31-133	131-160	184-348
R3.3	—	1-30	31-138	132-173	197-361
R3.5	—	1-30	31-134	123-161	185-349
IgH5.85	—	1-30	31-300	290-328	351-516
LV1.1.3	1-59	—	60-352	345-389	413-577
LV1.1.7	1-59	—	60-350	345-380	404-568
LV1.1.9	1-59	—	60-352	345-389	413-577
LV1.1.11	1-59	—	60-352	345-374	398-556
LV1.1.12	1-59	—	60-344	340-393	417-581
LV1.1.33	1-59	—	60-349	345-383	407-571
LV1.1.34	1-59	—	60-349	345-380	404-568
LV1.1.35	1-59	—	60-352	345-401	425-589
LV1.1.37	1-59	—	60-360	345-383	407-571
LV2.1.1	—	—	1-191	189-236	260-402
LV2.1.2	—	—	1-197	189-233	257-421
LV2.1.3	—	—	1-15	5-64	88-252
LV2.1.4	—	—	1-196	189-233	254-421
LV2.1.5	—	—	1-194	189-221	245-409
LV3.1.10	1-57	—	58-345	343-381	405-569
LV3.1.11	1-57	—	58-344	342-371	395-559
LV3.1.12	1-57	—	58-347	343-375	399-563
LV3.1.13	1-57	—	58-351	343-387	411-575
LV3.1.33	1-57	—	58-353	343-372	397-560
LV3.1.34	1-57	—	58-346	340-360	348-548
LV3.1.35	1-57	—	58-353	343-372	397-560
LV3.1.36	1-51	—	52-347	337-366	390-554
LV3.1.37	1-57	—	58-348	340-375	399-563
Cp1.1	113-169	—	170-455	452-484	508-670
Cp1.2	112-168	—	169-459	454-474	499-551
Cp1.4	—	—	1-217	207-251	276-439
Cp1.6	134-190	—	191-482	476-523	548-711
Cp1.8	109-165	—	166-452	?	514-678

Tabelle 61: Lokalisierung von Leaderregion, SMART II™ Oligonukleotid, V-Region, CDR3 und C-Region
(Fortsetzung)

Klon	Leader-region	SMART II™ Oligonukleotid	V-Region	CDR3	C-Region
Cp1.9	113-169	—	170-462	455-481	507-669
Cp1.10	111-167	—	168-459	453-500	524-688
Cp1.11	109-165	—	166-461	451-483	507-671
Cp1.13	109-165	—	166-455	451-486	510-674

8.9 Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene

Tabelle 62: Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene

Klon	CDR3					Humane Entsprechungen
	3' Ende der V-Region	N1	D-Region	N2	5'-Ende der J-Region	
R3.1	TGT	TCA	AGAGATAGC	A	ACTATGATTACTGG	IGHV3-23*01 IGHD5-24*01 IGHJ4*01
R3.3	TGTGCGA	GTAGAGACCC	TGGTACCGGG	GTA	TTTGACTACTGG	IGHV3-23*01 IGHD3-10*01 IGHJ4*01
R3.5	TGTGCGAGAGA	T	TATGGTGGGGTAGT	ACC	GACTACTGG	IGHV3-53*01 IGHD3-10*01 IGHJ4*01
IgH5.85	TGTGCAAAAG	T	TGAACACCGGGG	GGGA	TTTTTGATCTGG	IGHV3-23*01 IGHD4-23*01 IGHJ3*02
LV1.1.3	TGTGCAA	GGTTTGA	GTTTAGGGGA	CTATT	CTATATTGACTACTGG	IGHV1-24*01 IGHD3-16*01 IGHJ4*01
LV1.1.7	TGTGC	CAAGGAGGA	AGCGGGTGG	GCTAGG	CTACTGG	IGHV1-24*01IGHD6-13*01IGHJ4*01
LV1.1.9	TGTGCAA	GGACGGATAGCG	ACTATGCTGGGGG	GTTCA	ACTACTGG	IGHV1-24*01 IGHD3-10*02 IGHJ4*03
LV1.1.11	TGTGCAA	GTGGG	GTGGGAGCGAC	CA	ACTGG	IGHV1-24*01 IGHD1-26*01 IGHJ4*01
LV1.1.12	TGTG	GAAGGGCCGG	ACTACTGTATCGA	GAGTAACTGTCCGGACGGGG	CTACTGG	IGHV1-2*01 IGHD1-1*01 IGHJ4*01

Tabelle 62: Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene (Fortsetzung)

Klon	CDR3					Humane Entsprechungen
	3' Ende der V-Region	N1	D-Region	N2	5'-Ende der J-Region	
LV1.1.33	TGTGC	G	AGGCTGTTGTA	TCGGGGG	TACTTTTGACTACTGG	IGHV1-24*01 IGHD2-2*01 IGHJ4*01
LV1.1.34	TGTGC	CAGGGGACGCGGGC	CTGGGG	TTGACTACTGG	TGTGC	IGHV1-24*01 IGHD7-27*01 IGHJ4*01
LV1.1.35	TGTCAA	GGATTGGG	TGTATCGGGAGTAGCTG	TGCTACGAGGCC	CTTTGACTACTGG	IGHV1-24*01 IGHD2-15*01 IGHJ4*01
LV1.1.37	TGTGCA	C	GAGCTGGGTAC	CCG	AACTGGTTCAACTACTGG	IGHV1-24*01 IGHD5*01 IGHJ5*01
LV2.1.1	TGT	ACCACTAGAG	GTGGGGTCTACTAC	GATATGGACGACA	ACTACTGG	IGHV3-74*01 IGHD1-26*01 IGHJ4*03
LV2.1.2	TGTGCAAGA	AGGTCGGAGG	TAGCGGGTGGGCC	CCTAGC	CTACTGG	IGHV3-74*01 IGHD6-6*01 IGHJ4*03
LV2.1.3	TGTGCGAAAAGA	TGGGAACGATAGCG AC	TATATTGGCCGG	AATGTGCCCGCA	GACTACTGG	IGHV3-74*01 IGHD3-9*01 IGHJ4*01
LV2.1.4	TGTGCCAG		TATCGGCATACC	AAACCGCAATA	CTTTGGGTATCTGG	IGHV3-74*01 IGHD3-16*02 IGHJ3*02
LV2.1.5	TGTGCG	TCGGTCCG	TGCCAACA	C	CGATCTCTGG	IGHV3-48*03 IGHD4-4*01 IGHJ2*01
LV3.1.10	TGT	ATC	AGTAGATTGAAG	GCTTTAAAGAGCAACT	ACTGG	IGHV3-74*02 IGHD2-2*01 IGHJ1*01

Tabelle 62: Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene (Fortsetzung)

Klon	CDR3					Humane Entsprechungen
	3' Ende der V-Region	N1	D-Region	N2	5'-Ende der J-Region	
LV3.1.11	TGT	ACAAT	ACTACGATAGCT	GGGG	TACTGG	IGHV3-48*03 IGHD4-4*01 IGHJ4*01
LV3.1.12	TGTGC		GACTTCGGGG	CCGGGTTCAAG	TACTGG	IGHV3-74*02 IGHD4-23*01 IGHJ4*03
LV3.1.13	TGCGCCAGA	TCAGG	GACTACGATAGCGACT	AGTTATGTA	TACTGG	IGHV3-21*01 IGHD4-23*01 IGHJ4*01
LV3.1.33	TGTGCGCGGA		TAGC	G	ACCTTGACTACTGG	IGHV3-21*01 IGHD6-6*01 IGHJ4*01
LV3.1.34	TGTGCGA	CCCCAGGGC			ACTGG	IGHV3-21*01 IGHJ4*01
LV3.1.35	TGTGCGCGCGA		TAGC	G	ACCTTGACTACTGG	IGHV3-21*01 IGHD6-6*01 IGHJ4*01
LV3.1.36	TGTGCGCGCGA		TAGC	G	ACCTTGACTACTGG	IGHV3-21*01 IGHD6-6*01 IGHJ4*01
LV3.1.37	TGTGCGCAGA	C	TGGCGATAGCGACTA	TG	GACTACTGG	IGHV3-48*03 IGHD5-12*01 IGHJ4*01
Cp1.1	TGTG		TGGTAGCGACTAC	CCTCCAG	GACTACTGG	IGHV3-21*01 IGHD2-15*01 IGHJ4*01
Cp1.2	TGTTTCG	C	CTAT	CCAGTTT	TGG	IGHV3-21*01 IGHD2-2*01 IGHJ1*01

Tabelle 62: Sequenzen der CDR3 und die dazu entsprechenden humanen Gene (Fortsetzung)

Klon	CDR3					Humane Entsprechungen
	3' Ende der V-Region	N1	D-Region	N2	5'-Ende der J-Region	
Cp1.4	TGTGCGACAGAGA	TCGGAG	TACTCACTATGATTAC	TTCCAGTTT	TGG	IGHV3-23*01 IGHD5-12*01 IGHJ1*01
Cp1.6	TGTGCGA	GATTTCGTGG	GGCGACAAT	GGGGCGACCACTTCCCGTTT	TGG	IGHV3-23*04 IGHD5-24*01 IGHJ1*01
Cp1.8	Nicht klassifizierbar					IGHV3-21*01
Cp1.9	TGTACGAG		GTGGGAAC	CTTTG	TACTGG	IGHV3-74*02 IGHD4-23*01 IGHJ4*01
Cp1.10	TGTGCGA	GGGGACCA	ATAGTAGCGGGTGG	GCTAGAAA	TTGACTACTGG	IGHV3-23*04 IGHD6-13*01 IGHJ4*01
Cp1.11	TGTGCGACAGAGA	TCCTAA	CTATGC		TGACTACTGG	IGHV3-11*01 IGHD2-2*01 IGHJ4*01
Cp1.13	TGTGC	GACCCA	AGTAGCGGGTGG	CCCCCG	CTACTGG	IGHV3-74*02 IGHD6-13*01 IGHJ4*01

8.10 Veröffentlichter Teil der C-Region der schweren Kette des felines IgM (Cho et al., 1998)

1	GACTCACTAT	AGGGCAAGCA	GTGGTATCAA	CGCAGAGTAC	GCGGGTGGGT	CCCATCTGAC
61	TACTGGGGCC	AAGGAGCCCT	GGTGACGGTG	TCCTCAGAGA	CCTCATCCCG	TCCAAATCTC
121	TTCCCCCTCA	TCACCTGTGA	GAGCTCCCTG	TCCGATGAGC	CCCTGGTGGC	CATGGGCTGC
181	CTGGCCCGGG	ACTTCCTGCC	CAGCTCCGTC	ACCTTCTCCT	GGAACATAAA	GAACAACAGT
241	GTGGTCAACA	ACCAGGACAT	CCAGACCTTC	CCTCCAGTCC	TGAGAGAGGG	CAAGTACGAT
301	GGCTACCTCT	CAGGTGCTCC	TGCCCTCCGT	GGATGTCTCT	CAGGGTTTCA	ATGACTTCCT
361	CACATGCAAT	GTGAAACACC	CCAAGGGCAA	CAGTGAGGTG	AACGTGCCCC	TCCAGTGCC
421	TGTAGAGCTG	TCCCCAACG	TGACTGTCTT	CATCCCACCC	CGTGACGCCT	TCTCTGACAA
481	CAACCAGCGC	ACATCCCAGC	TCCTCTGTCA	GGCAACAGGC	TTCAGCCCCA	AGAAGATCTC
541	TGTGTCTCTG	CTTCGTGACG	GGAAGCCCAT	CAAGTCGGGC	TTCAACCCAG	GCAACGTGGA
601	GGCTGAGAAC	CAAGGGCCCC	GACCTGTGAC	CTACAGGGTC	CTCAGCACGC	TGACCATCAC
661	CGAGAATGCC	TGGCTCAGCC	AGAGCGTGTT	CACCTGCAAT	GTGGAGACAC	GTGGGCTGAC
721	CTTCAAGAAG	AACGTGTCTT	CCGCATGCAT	CCTCAACACG	CAGGCCAGCA	TCAGAATCTT
781	CGCCATTCCC	CCCACCTTGG	CCAGCATCTT	CCAAACCAAG	TCGGCCAAGC	TGTCCTGCAG
841	GGTCGTAGAC	CTGACCACCC	GCGACAGCCT	GAACATCTCC	TGGACCCGCC	AGAATGGCGA
901	CTTTCTGCCA	ACCACCACCA	TCTTCCAGAG	CAACCTCAAC	AACACCTTCA	GTGCCACGGG
961	GGAGGCCTCC	GTCTGTGACG	AGGACTGGGA	GTCAGGGGAG	GACTTCACCT	GCACGGTGAC
1021	CCACACAGAT	CTGCCCTCAC	CACCTGAAGA	GACCATCTCT	AAACCCAAGG	ACGTCAACAA
1081	GCAACCGCCC	TCCGTCTACG	TCCTGCCACC	CAGCCGGGAG	CAGCTGAGCC	TGCGGGAGTC
1141	AGCCACAGTC	ACTTGCCTGG	TGAAGGGCTT	CTCACCCGCA	GATGTGTTCT	TGCAATGGCT
1201	GCAGAAAGGC	CAACCCATGT	CCTCTGAGAG	TTACGTGACC	AGTGACCCGA	AGCCCCGAGC
1261	CCAGGACCCC	CACCTCTACT	TTGTCCACAG	CACCCTGACT	GTGAGTGAGG	AGGAGTGAGG
1321	CTCGGGGGAG	ACCTACACCT	GTGTTGTGGG	CCACGAGGCC	CTGCCCCACA	TGGTGACGGA
1381	GAGGAGCGTG	GACAAGTCCA	CCGGTAAACC	CACCCGTGAC	AACGTGTCCC	TGGTCTTGTC
1441	TGACACGGCC	ACCACCTGCT	ACTGACCTGT	GGGCCGCCCT	ACTCCGGGTG	GATCCCAGAG
1501	TCCCTGGGGA	ACCCATCGCC	TGTGTGTGCA	TGTGTGCAAA	CTAACCGTGT	CAATGGGGTG
1561	AGATGTGGCG	TTTTTTCAAA	TTTGAATAA	AAACTTCCTT	TC	

8.11 Verzeichnis der Klone (Sequenzen der Inserts)

R2.2

1	GACTCACTAT	AGGGCAAGCA	GTGGTATCAA	CGCAGAGTAC	GCGGGTGGGT	CCCATCTGAC
61	TACTGGGGCC	AAGGAGCCCT	GGTGACGGTG	TCCTCAGAGA	CCTCATCCCG	TCCAAATCTC
121	TTCCCCCTCA	TCACCTGTGA	GAGCTCCCTG	TCCGATGAGC	CCCTGGTGGC	CATGGGCTGC
181	CTGGCCCGGG	ACTTCCTGCC	CAGCTCCGTC	ACCTTCTCCT	GGAACATAAA	GAACAACAGT
241	GTGGTCAACA	ACCAGGACAT	CCAGACCTTC	CCTCCAGTCC	TGAGAGAGGG	CAAGTACGA

R2.6

1	AGTGGTATCA	ACGCAGAGTA	CGCGGGTGGG	TTTGACTACT	GGGGCCAAGG	AGCCCTGGTG
61	ACGGTGTCTT	CAGAGACCTC	ATCCCGTCCA	AATCTCTTCC	CCCTCATCAC	CTGTGAGAGC
121	TCCCTGTCCG	ATGAGCCCTT	GGTGGCCATG	GGCTGCCTGG	CCCGGGACTT	CTGCCCAGC
181	TCCGTACCTT	TCTCCTGGAA	CTACAAGAAC	AACAGTGTGG	TCAACAACCA	GGACATCCAG
241	ACCTTCCCTC	CAGTCCTGAG	AGAGGGCAAG	TACGA		

R3.1

1	AAGCAGTGGT	ATCAACGCAG	AGTACGCAGG	CTCCGTGAAG	GGCCGATTCA	CCATCTCCAG
61	AGACAACGCC	AAGAACACGC	TGTATCTGCA	GATGAACAGC	CTGAAGACCG	AGGACACGGC
121	CACATATCAC	TGTTCAAGAG	ATAGCAACTA	TGATTACTGG	GGCCAAGGAG	CCCTGATGAC
181	GGTGTCTCTA	GAGACCTCAT	CCCGTCCAAA	TCTCTTCCCC	CTCATCACCT	GTGAGAGCTC
241	CCTGTCCGAT	GAGCCCCTGG	TGGCCATGGG	CTGCCTGGCC	CGGGACTTCC	TGCCCAGCTC
301	CGTCACCTTC	TCCTGGAAC	ACAAGAACAA	CAGTGTGGTC	AACAACC	

R3.3

1	AAGCAGTGGT	ATCAACGCAG	AGTACGCAGG	CTCCGTGAAG	GGCCGATTCA	CCATCTCCAG
61	AGACAACGCC	AAGAACACGC	TGTATCTGCA	GATGAACAGC	CTGAAGACCG	AGGACACGGC
121	CACATATTAC	TGTGCGAGTA	GAGACCCTGG	TACCGGGGTA	TTTGACTACT	GGGGCCAAGG
181	AGCCCTGGTG	ACGGTGTCTT	CAGAGACCTC	ATCCCGTCCA	AATCTCTTCC	CCCTCATCAC

Anhang

241	CTGTGAGAGC	TCCCTGTCCG	ATGAGCCCCT	GGTGGCCATG	GGCTGCCTGG	CCCGGGACTT
301	CCTGCCCAGC	TCCGTACACT	TCTCCTGGAA	CTACAAGAAC	AACAGTGTGG	TCAACAACCA

R3.5

1	AAGCAGTGGT	ATCAACGCAG	ACTCCGTGAA	GGGCCGATTC	ACCATCTCCA	GAGACAACGC
61	CAAGAACACG	CTGTATCTGC	AGATGAACAG	CCTGAAGACC	GAGGACACGG	CCACATATTA
121	CTGTGCGAGA	GATTATGGGT	GGGGTAGTAC	CGACTACTGG	GGCCAAGGAG	GCCTGGTGAC
181	GGTGTCTCA	GAGACCTCAT	CCCGTCCAAA	TCTCTTCCCC	CTCATCACCT	GTGAGAGCTC
241	CCTGTCCGAT	GAGCCCCTGG	TGGCCATGGG	CTGCCTGGCC	CGGGACTTCC	TGCCCAGCTC
301	CGTCACCTTC	TCCTGGAAC	ACAAGAACAA	CAGTGTGGTC	AACAACCAAT	

IgH5.85

1	AAGCAGTGGT	ATCAACGCAG	AGTCGGGGGG	AGACCTGGTG	AAGCCCCGGG	GGTCCCTGAG
61	ACTCACCTGT	GTGGCCTCTG	GATTACACCT	CAGTAGCTAT	GGAATGAGCT	GGGTCCGCCA
121	GGTCCAGGG	AAGGGGCTGC	AGTGGGTGCG	ATATATTAGA	TACGATGGAA	GTAGCACAAA
181	CTATGCAGAC	TCCGTGAAGG	GCCGATTAC	CATCTCCAGA	GACAACGCCA	AGAACACGCT
241	GTATCTGCAG	ATGAACAGCC	TGAAGACCGA	GGACACGGCC	ACATATTACT	GTGCAAAAGT
301	TGAACACCGG	GGGGGATTTT	GTATCTGGGG	CCAAGGTACC	CAGGTACCCG	TCTCCCAAGA
361	GACCTCATCC	CGTCCAAATC	TCTTCCCCCT	CATCACCTGT	GAGAGCTCCC	TGTCCGATGA
421	GCCCCTGGTG	GCCATGGGCT	GCCTGGCCCG	GGACTTCCTG	CCCAGCTCCG	TCACCTTCTC
481	CTGGAAC	AAGAACAACA	GTGTGGTCAA	CAACCA		

LV1.1.3

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCTACAGGT	GTGCACTCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCT	GGGGCTGAAG	TGAGGAAGCC	TGAGGCATCA	GTGAAGATCT
121	TCTGCAAAGC	ATCTGGATAC	AGCTTCACTG	ATTACTATAT	GTACTGGGTG	CGACAGGCTC
181	CTGCACAAGG	GTTTGAATGG	ATGGGAAGCA	TTGACCCTGA	AGATGGTTCT	ACAAGCTATG
241	CACAGAAGTT	CCAGGGCAGA	CTCACCTGA	CAGCAGACAC	ATCCACAAAC	ACAGCCTACA
301	TGGAGCTGAG	CAGTCTGAGG	TCTACAGACA	CGGCCGTGTA	TTATTGTGCA	AGGTTTGAGT
361	TTAGGGGACT	ATTCTATATT	GACTACTGGG	GCCAAGGAGC	CCTGGTGACG	GTGTCTTCAG
421	AGACCTCATC	CCGTCCAAAT	CTCTTCCCC	TCATCACCTG	TGAGAGCTCC	CTGTCCGATG
481	AGCCCTGGT	GGCCATGGGC	TGCCTGGCCC	GGGACTTCCT	GCCCAGCTCC	GTACCTTCT
541	CCTGGAACTA	CAAGAACAAC	AGTGTGGTCA	ACAACCA		

LV1.1.7

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCTACAGGT	GTGCACTCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCT	GGGGCTGAAG	TGAGGAAGCC	TGAGGCATCA	GTGAAGATCT
121	TCTGCAAAGC	ATCTGGATAC	AGCTTCACTG	ATTACTATAT	GTACTGGGTG	CGACAGGCTC
181	CTGCACAAGG	GTTTGAATGG	ATGGGAAGCA	TTGACCCTGA	AGATGGTTCT	ACAAGCTATG
241	CACAGAAGTT	CCAGGGCAGA	CTCACCTGA	CAGCAGACAC	ATCCACAAAC	ACAGCCTACA
301	TGGAGCTGAG	CAGTCTGAGG	TCTACAGACA	CGGCCGTGTA	TTATTGTGCC	AAGGAGGAAG
361	CGGGTGGGCT	AGGCTACTGG	GGCCAAGGAG	CCCTGGTGAC	GGTGTCTCA	GAGACCTCAT
421	CCCGTCCAAA	TCTCTTCCCC	CTCATCACCT	GTGAGAGCTC	CCTGTCCGAT	GAGCCCCTGG
481	TGGCCATGGG	CTGCCTGGCC	CGGGACTTCC	TGCCCAGCTC	CGTCACCTTC	TCCTGGAAC
541	ACAAGAACAAC	CAGTGTGGTC	AACAACCA			

LV1.1.9

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCGACAGGT	GTGCACTCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCT	GGGGCTGAAG	TGAGGAAGCC	TGGGGCATCA	GTGAAGATCT
121	TCTGCAAAGC	ATCTGGATAC	AGCTTCACTG	ATTACTATAT	CCACTGGTTG	CGACAGGCTC
181	CTGAACAAGG	GCTTGAATGG	ATGGGAAGAA	TTGACCCTGA	AGATGGTTCT	ACAAGCTATG
241	CACAGAAGTT	CCAGGGCAGA	CTCACCTGA	CAGCAGACAC	ATCCACAAAC	ACAGCCTACA
301	TGGAGCTGAG	CAGTCTGAGG	TCTGCAGACA	CAGCCATGTA	TTACTGTGCA	AGGACGGATA
361	GCGACTATGC	TGGGGGGTTC	AACTACTGGG	GCCCCGGGAC	CCTGGTCACC	GTGTCTTCAG
421	AGACCTCATC	CCGTCCAAAT	CTCTTCCCC	TCATCACCTG	TGAGAGCTCC	CTGTCCGATG
481	AGCCCTGGT	GGCCATGGGC	TGCCATGGCC	GGGACTTCCT	GCCCAGCTCC	GTACCTTCT
541	CCTGGAACTA	CAAGAACAAC	AGTGTGGTCA	ACAACCA		

LV1.1.11

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCTACAGGT	GTGCACTCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCT	GGGGCTGAAG	TGAGGAAGCC	TGAGGCATCA	GTGAAGATCT
121	TCTGCAAAGC	ATCTGGATAC	AGCTTCACTG	ATTACTATAT	GTACTGGGTG	CGACAGGCTC
181	CTGCACAAGG	GTTTGAATGG	ATGGGAAGCA	TTGACCCTGA	AGATGGTTCT	ACAAGCTATG
241	CACAGAAGTT	CCAGGGCAGA	CTCACCTGA	CAGCAGACAC	ATCCACAAAC	ACAGCCTACA
301	TGGAGCTGAA	CAGTCTGAGG	TCTACAGACA	CGGCCGTGTA	TTATTGTGCA	AGTGGGGTGG

361	GAGCGACCAA	CTGGGGCCAA	GGAGCCCTGG	TGACGGTGTC	CTCAGAGACC	TCATCCCGTC
421	CAATCTCTT	CCCCCTCATC	ACCTGTGAGA	GCTCCCTGTC	CGATGAGCCC	CTGGTGGCCA
481	TGGGCTGCCT	GGCCCGGGAC	TTCTTGCCCA	GCTCCGTAC	CTTCTCTCTG	AACTACAAGA
541	ACAACAGTGT	GGTCAAACAA	CCA			

LV1.1.12

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCAACAGGT	GTTCAATCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCG	GGACTGAAGT	GAGGAAGCCT	GGGGCATCAG	TGAAGATCTT
121	CTGCAAAGCG	TCTGGATACA	GCTTCACTGA	TCACTATATG	CGCTGGTGGT	GACAGGCCCC
181	TGGACAAGGG	TTTGAGTGGA	TGGGAGGCCT	TGACCCTGAA	GATGGTTCTT	CTAGGCACAG
241	AAGTTCCAGG	GCAAACCTAC	CCTGACAGCA	GACACATCCA	CAGACACAGC	CTACATGGAA
301	CTGAGCAGTC	TGGGGTCTGC	AGACACAGCC	GTGTATTACT	GTGGAAGGGG	CGGACTACTG
361	TATCGAGAGT	AACGTGTCGG	ACGGGGCTAC	TGGGGCCAAG	GAGTCTGTGG	GACGGTGTCC
421	TCAGAGACCT	CATCCCGTCC	AAATCTCTTC	CCCCTCATCA	CCTGTGAGAG	CTCCCTGTCC
481	GATGAGCCCC	TGGTGGCCAT	GGGCTGCCTG	GCCCCGGACT	TCCTGCCAG	CTCCGTACCC
541	TTCTCCTGGA	ACTACAAGAA	CAACAGTGTG	GTCAACAACC	A	

LV1.1.33

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCGACAGGT	GTGCACTCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCT	GGGGCTGAAG	TGAGGAAGCC	TGGGGCATCA	GTGAAGATCT
121	TCTGCAAAGC	ATCTGGATAC	AGCTTCACTG	ATTACTATAT	GCACTGGTTG	CGACAGGCTC
181	CTGAACAAGG	GCTTGAGTGG	ATGGGAAGAA	TTGACCCCTGA	AGATGGTTCT	ACAAGCTATG
241	CACAGAAGTT	CCAGGGCAGA	CTCACCCCTGA	CAGCAGACAC	ATCCACAAAC	ACAGCCTACA
301	TGGAGCTGAG	CAGTCTGAGG	TCTGCAGACA	CAGCCATGTA	TTACTGTGCG	AGGCTGTTGT
361	ATCGGGGGTA	CTTTGACTAC	TGGGGCCAAG	GAGCCCTGGT	GACGGTGTCC	TCAGAGACCT
421	CATCCCGTCC	AAATCTCTTC	CCCCTCATCA	CCTGTGAGAG	CTCCCTGTCC	GATGAGCCCC
481	TGGTGGCCAT	GGGCTGCCTG	GCCCCGGACT	TCCTGCCAG	CTCCGTACCC	TTCTCCTGGA
541	ACTACAAGAA	CAACAGTGTG	GTCAACAACC	A		

LV1.1.34

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCGACAGGT	GTGCACTCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCT	GGGGCTGAAG	TGAGGAAGCC	TGGGGCATCA	GTGAAGATCT
121	TCTGCAAAGC	ATCTGGATAC	AGCTTCACTG	ATTACTATAT	GCACTGGTTG	CGACAGGCTC
181	CTGAACAAGG	GCTTGAGTGG	ATGGGAAGAA	TTGACCCCTGA	AGATGGTTCT	ACAAGCTATG
241	CACAGAAGTT	CCAGGGCAGA	CTCACCCCTGA	CAGCAGACAC	ATCCACAAAC	ACAGCCTACA
301	TGGAGCTGAG	CAGTCTGAGG	TCTGCAGACA	CAGCCATGTA	TTACTGTGCC	AGGGGACGCG
361	GGCCTGGGGT	TGACTACTGG	GGCCAAGGAG	CCCTGGTGAC	GGTGTCTCTA	GAGACCTCAT
421	CCCGTCCAAA	TCTCTTCCCC	CTCATCACCT	GTGAGAGCTC	CCTGTCCGAT	GAGCCCCTGG
481	TGGCCATGGG	CTGCCTGGCC	CGGGACTTCC	TGCCCAGCTC	CGTCACCTTC	TCCTGGAAC
541	ACAAGAACAA	CAGTGTGGTC	AACAACCA			

LV1.1.35

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCGACAGGT	GTGCACTCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCT	GGGGCTGAAG	TGAGGAAGCC	TGGGGCATCA	GTGAAGATCT
121	TCTGCAAAGC	ATCTGGATAC	AGCTTCACTG	ATTACTATAT	GCACTGGTTG	CGACAGGCTC
181	CTGAACAAGG	GCTTGAGTGG	ATGGGAAGAA	TTGACCCCTGA	AGATGGTTCT	ACAAGCTATG
241	CACAGAAGTT	CCAGGGCAGA	CTCACCCCTGA	CAGCAGACAC	ATCCACAAAC	ACAGCCTACA
301	TGGAGCTGAG	CAGTCTGAGG	TCTGCAGACA	CAGCCATGTA	TTACTGTGCA	AGGATTGGGT
361	GTATCGGGAG	TAGCTGTGCT	ACGAGGCCCT	TTGACTACTG	GGGCCAAGGA	GCCTTGGTGA
421	CGGTGTCTCT	AGAGACCTCA	TCCCGTCCAA	ATCTCTTCCC	CCTCATCACC	TGTGAGAGCT
481	CCCTGTCCGA	TGAGCCCCTG	GTGGCCACGG	GCTGCCTGGC	CCGGGACTTC	CTGCCAGCT
541	CCGTACCTT	CTCCTGGAAC	TACAAGAACA	ACAGTGTGGT	CAACAACCA	

LV1.1.37

1	CAATGGACTG	GAGCTGGAGA	ATCCTCTACC	TGGTGGCAGT	GGCTACAGGT	GTGCACTCCC
61	AGGTTTTGCT	GGTGCAGTCT	GGGGCTGAAG	TGAGGAAGCC	TGAGGCATCA	GTGAAGATCT
121	TCTGCAAAGC	ATCTGGATAC	AGCTTCACTG	ATTACTATAT	GTACTGGGTG	CGACAGGCTC
181	CTGCACAAGG	GTTTGAGTGG	ATGGGAAGCA	TTGACCCCTGA	AGATGGTTCT	ACAAGCTATG
241	CACAGAAGTT	CCAGGGCAGA	CTCACCCCTGA	CAGCAGACAC	ATCCACAAAC	ACAGCCTACA
301	TGGAGCTGAG	CAGTCTGAGG	TCTACAGACA	CGGCCGTGTA	TTATTGTGCA	CGAGCTGGGT
361	ACCCGAAGCTG	GTTCAACTAC	TGGGGCCCCG	GGACCCCTGGT	CACCGTGTCT	TCAGAGACCT
421	CATCCCGTCC	AAATCTCTTC	CCCCTCATCA	CCTGTGAGAG	CTCCCTGTCC	GATGAGCCCC
481	TGGTGGCCAT	GGGCTGCCTG	GCCCGGACT	TCCTGCCAG	CTCCGTACCC	TTCTCCTGGA
541	ACTACAAGAA	CAACAGTGTG	GTCAACAACC	A		

LV2.1.1

1	ATGGACATAC	TTTGTTCCAG	GCTCCAGGAA	AGGGGCTGCT	GTGGGTCGCT	TCAATTCGTG
61	GTGATGGAAC	TGCCACATAC	TACCCAGACT	CAGTGAGGGG	CCGATTACACC	ATCTCCAGAG
121	ACAACGCCAA	GAAAATGCTG	TATCTGCAGA	TGAACAGTCT	AGAGACCGAG	GACACGGCCA
181	CATATTACTG	TACCACTAGA	GGTGGGGTCT	ACTACGATAT	GGACGACAAC	TACTGGGGTC
241	CCGGGACCCT	GGTCACCGTG	TCTTCAGAGA	CCTCATCCCG	TCCAAATCTC	TTCCCCCTCA
301	TCACCTGTGA	GAGCTCCCTG	TCCGATGAGC	CCCTGGTGGC	CATGGGCTGC	CTGGCCCCGG
361	ACTTCCTGCC	CAGCTCCGTC	ACCTTCTCCT	GGAAC TACAA	GA	

LV2.1.2

1	ATGGACATAC	TTTGTTCCAG	GCTCCAGGGA	AGGGGCTGCA	GTGGGTCGCG	CTCATTAATA
61	CTGATGGAAC	TAGAATATAC	TACGCAGATT	CCGCGAAGGG	CCGATTACACC	ATCTCCAGAG
121	ACAACGCCAA	GAACACGCTG	TATCTGCAGA	TGAACAGCCT	GAAGACCGAG	GACACGGCCA
181	CATATTACTG	TGCAAGAAGG	TCGGAGGTAG	CGGGTGGGCC	CCTAGCCTAC	TGGGGCCCCG
241	GGACCCTGGT	CACCGTGTCT	TCAGAGACCT	CATCCCGTCC	AAATCTCTTC	CCCCTCATCA
301	CCTGTGAGAG	CTCCCTGTCC	GATGAGCCCC	TGGTGGCCAT	GGGCTGCCTG	GCCCGGGACT
361	TCCTGCCCAG	CTCCGTCACC	TTCTCCTGGA	ACTACAAGAA	CAACAGTGTG	GTCAACAACC
421	A					

LV2.1.3

1	TTTCTGTGCG	AAAGATGGGA	ACGATAGCGA	CTATATTGGC	CGGAATGTGC	CGCGAGACTA
61	CTGGGGCCAA	GGAGCCCTGG	TGACGGTGTC	CTCAGAGACC	TCATCCCGTC	CAAATCTCTT
121	CCCCCTCATC	ACCTGTGAGA	GCTCCCTGTC	CGATGAGCCC	CTGGTGGCCA	TGGGCTGCCT
181	GGCCCGGGAC	TTCTTGCCCA	GCTCCGTCAC	CTTCTCCTGG	AACTACAAGA	ACAACAGTGT
241	GGTCAACAAC	CA				

LV2.1.4

1	ATGGACATAC	TTTGTTCCAG	GCTCCAGGGA	AGGGGCTGGA	GTGGGTCGCG	ACCATTGAAG
61	ATGATGGAAC	TATCACAACC	TACGCAGACT	CCGTGAAGGG	CCGATTACACC	ATCTCCAGAG
121	ACAACGCCAA	GAACACCCTG	TATTTGCAGA	TGAATTGCCT	GAGGACCGAG	GACACGGCCA
181	CATATTCTTG	TGCCAGTATC	GGCATAACAA	ACCGCAATAC	TTTGGGTATC	TGGGGCCAGG
241	GTACCCAGGT	CACCGTCTCC	CACGAGACCT	CATCCCGTCC	AAATCTCTTC	CCCCTCATCA
301	CCTGTGAGAG	CTCCCTGTCC	GATGAGCCCC	TGGTGGCCAT	GGGCTGCCTG	GCCCGGGACT
361	TCCTGCCCAG	CTCCGTCACC	TTCTCCTGGA	ACTACAAGAA	CAACAGTGTG	GTCAACAACC
421	A					

LV2.1.5

1	ATGGACATAC	TTTGTTCCAG	GCTCCAGGAA	AGGGGCCGCA	GTGGGTCGCG	ATAATAAGTA
61	CTAATGGAGG	TACCTCAATC	TACGCAGACT	CGGTGAGGGG	CCGATTACACC	ATCTCCAGAG
121	ACAACGCCAA	GAACGCGCTG	TATCTGGAGA	TGAATAGCCT	CAAGACCGAG	GACACGGCCA
181	CATATTACTG	TGCGTCGGTC	CGTGCCAAAC	CCGATCTCTG	GGGCCATGGA	ACCATAGTCA
241	CAGTGTCCTC	AGAGACCTCA	TCCCGTCCAA	ATCTCTTCCC	CCTCATCACC	TGTGAGAGCT
301	CCCTGTCCGA	TGAGCCCCTG	GTGGCCATGG	GCTGCCTGGC	CCGGGACTTC	CTGCCCAGCT
361	CCGTACCTT	CTCCTGGAAC	TACAAGAACA	ACAGTGTGGT	CAACAACCA	

LV3.1.10

1	ATGGAGTTTG	TGCTGGGCTG	GGTTTTCTCTG	GTTGCTATTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAT
61	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGACCTG	GTGAAGCCTG	GGGGGTCCCT	GAGACTCACC
121	TGCGTGGTCT	CTGGACTCAC	CTTCAGTAGC	CACTACATGT	TCTGGGTCCG	CCAGGCTCCG
181	GGGAAGGGGC	TGCAATGGGT	CGCATTTATT	AATCTCGATG	GATCTACCAC	CACCTATATA
241	GACTCCGTGA	AGGGCCGATT	CACCGTCTCTG	AGAGACAACG	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG
301	CAGATGGACA	GCCTCACGAC	CGAGGACACG	GCCACATATT	ACTGTATCAG	TAGATTGAAG
361	GCTTTAAAGA	GCAACTACTG	GGGCCCCGGG	ACCCTGGTCA	CCGTGTCTTC	AGAGACCTCA
421	TCCCGTCCAA	ATCTCTTCCC	CCTCATCACC	TGTGAGAGCT	CCCTGTCCGA	TGAGCCCCTG
481	GTGGCCATGG	GCTGCCTGGC	CCGGGACTTC	CTGCCCAGCT	CCGTACCTT	CTCCTGGAAC
541	TACAAGAACA	ACAGTGTGGT	CAACAACCA			

LV3.1.11

1	ATGGAGTTTG	TGCTGGGCTG	GGTGTTCCTG	GTTGCTCTTT	TAAAGGTATC	CAGTGTGACG
61	TGCAGCTGGT	GGAGTCTGGG	GGAGACCTGG	TGAAGCCTGG	GGGGTCCCTG	AGAGTCACTT
121	GTGTGGCCTC	TGGATTACACC	TTCGGGAATC	TTTATATGAA	CTGGGTCTGC	CAGGCTCCAG
181	GGAAAGGGCT	GCAGTGGGTC	GCATATATTA	GATATGATGG	AAGTAGCATA	TACTATGCAG
241	ACTCCGTGAA	GGCCCGATTG	ACCATTTCCA	GAGACAACGC	CAAGAACACG	CTGTATCTGC
301	AGATGAACAG	TCTGAAGACC	GAGGACACGA	CCACATATTA	CTGTACAATA	CTACGATAGC

361	TGGGGTACTG	GGGCCAAGGA	GCCCTGGTGA	CGGTGTCCTC	AGAGACCTCA	TCCCGTCCAA
421	ATCTCTTCCC	CCTCATCACC	TGTGAGAGCT	CCCTGTCCGA	TGAGCCCCTG	GTGGCCATGG
481	GCTGCCTGGC	CCGGGACTTC	CTGCCCAGCT	CCGTCACCTT	CTCCTGGAAC	TACAAGAACA
541	ACAGTGTGGT	CAACAACCA				

LV3.1.12

1	ATGGAGTTTG	TGCTGGGCTG	GGTTTTCTTG	GTTGCTCTTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAC
61	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGACCTG	GTGAAGCCTG	GGGGGTCCCT	GAGACTCACC
121	TGTGTGGCCT	CTGGATTAC	CTTCAGTACC	TACTACATGA	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
181	GGGAAGGGGC	TTCAGTGGGT	CGCATATATT	AAGAATGATG	GGAGTATCAC	AAACTACGCA
241	GAATCCGTGA	AGGGCCGATT	CACCCTCTCC	AGAGACAACA	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG
301	CAGATGAACA	ACCTCAAGCC	TGAGGACACG	GCCACATATT	ACTGTGCGAC	TTCCGGGGCC
361	GGGTTCAAGT	ACTGGGGCCC	CGGGACCCTG	GTCACCGTGT	CTTCAGAGAC	CTCATCCCCG
421	CCAAATCTCT	TCCCCCTCAT	CACCTGTGAG	AGTCCCTGT	CCGTGAGCC	CCGTGTGGCC
481	ATGGGCTGCC	TGGCCCGGGA	CTTCCTGCCC	AGCTCCGTCA	CCTTCTCCTG	GAAGTACAAG
541	AACAACAGTG	TGGTCAACAA	CCA			

LV3.1.13

1	ATGGAGTTTG	TGCTGGGCTG	GGTTTTCTTG	GTTACTCTTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAT
61	GTGCAGTTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGACCTG	GTGAAGCCTG	GGGGGTCCCT	GAGACTCACC
121	TGTGCAGCCT	CTGGATTAC	CTTCAGTAAC	TACTACATGA	GCTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
181	GGGAAGGGGC	TACAGTGGGT	CGCATGGATT	AATCGTAATG	GACAAGACAT	ATGGTACGCT
241	GACTCCGTGA	AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAACG	CCAAGAACAC	GCTGGATCTG
301	CTTATGAACA	GCCTGAAGAC	CGAGGACACG	GCCACATACT	ACTGCGCCAG	ATCAGGGACT
361	ACGATAGCGA	CTAGTTATGT	ATACTGGGGC	CAAGGAGCCC	TGGTGACGGT	GCTCTCAGAG
421	ACCTCATCCC	GTCCAAATCT	CTTCCCCCTC	ATCACCTGTG	AGAGCTCCCT	GTCCGATGAG
481	CCCCTGGTGG	CCATGGGCTG	CCTGGCCCCG	GACTTCCTGC	CCAGTCCGT	CACCTTCTCC
541	TGGAACACAG	AGAACAACAG	TGTGGTCAAC	AACCA		

LV3.1.33

1	ATGGAGTTTG	TGCTGGGCTG	GGTTTTCTTG	GTTACTCTTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAC
61	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGACCTG	GTGAAGCCTG	GGGGGTCTCT	GAGACTCACC
121	TGTGTGGCCT	CTGGATTAC	CTTCAGTAGC	TATAGCATGA	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
181	GGGAAGGGGC	TGCAGTGGGT	CGCATATATT	AGATATGATG	GAAGTAGCAT	ATACTATGCA
241	GACTCCGTGA	AGGGCCGATT	CACCGTCTCC	AGAGACAACG	CCAAGAACAC	GCTGTCTCTG
301	CAGATGAACA	GTCTGAAGAC	CGAGGACACG	GCCACATATT	ACTGTGCGCG	CGATAGCGAC
361	CTTGACTACT	GGGGCCAAGG	AGCCCTGGTG	ACGATATCCT	CAGAGACCTC	ATCCCGTCCA
421	AATCTCTTCC	CCCTCATCAC	CTGTGAGAGC	TCCCTGTCCG	ATGAGCCCCT	GGTGGCCATG
481	GGCTGCCTGG	CCCGGGACTT	CCTGCCCAGC	TCCGTACCTT	TCTCCTGGAA	CTACAAGAAC
541	AACAGTGTGG	TCAACAACCA				

LV3.1.34

1	ATGGAGTTTG	TGCTGGGCTG	GGTTTTCTTG	GTTACTCTTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAC
61	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGACCTG	GTGAAGCCTG	GGGGGTCTCT	GAGACTCACC
121	TGTGTGGCCT	CTGGATTAC	CTTCAGTAGC	TATAGCATGA	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
181	GGGAAGGGGC	TGCAGTGGGT	CGCATATATA	AGTAGTGGAG	GTAGCACATA	GTACACAGAC
241	TCCGTGAAGG	GCCGATTAC	CATCTCCAGA	GACAACGGCA	AGAACACGCT	GTATCTGCAG
301	ATGAACAGCC	TCAAGACCGA	GGACACGGCC	ACATATTACT	GTGCGACCCC	AGGGCACTGG
361	GGCCAAGGAG	CCCTGGTGAC	GGTGTCTCTA	GAGACCTCAT	CCCGTCCAAA	TCTCTTCCCC
421	CTCATCACCT	GTGAGAGCTC	CCTGTCCGAT	GAGCCCCTGG	TGGCCATGGG	CTGCCTGGCC
481	CGGGACTTCC	TGCCCAGCTC	CGTCACCTTC	TCCTGGAAC	ACAAGAACAA	CAGTGTGGTC
541	AACAACCA					

LV3.1.35

1	ATGGAGTTTG	TGCTGGGCTG	GGTTTTCTTG	GTTACTCTTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAC
61	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGACCTG	GTGAAGCCTG	GGGGGTCTCT	GAGACTCACC
121	TGTGTGGCCT	CTGGATTAC	CTTCAGTAGC	TATAGCATGA	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
181	GGGAAGGGGC	TGCAGTGGGT	CGCATATATT	AGATATGATG	GAAGTAGCAT	ATACTATGCA
241	GACTCCGTGA	AGGGCCGATT	CACCGTCTCC	AGAGACAACG	CCAAGAACAC	GCTGTCTCTG
301	CAGATGAACA	GTCTGAAGAC	CGAGGACACG	GCCACATATT	ACTGTGCGCG	CGATAGCGAC
361	CTTGACTACT	GGGGCCAAGG	AGCCCTGGTG	ACGATATCCT	CAGAGACCTC	ATCCCGTCCA
421	AATCTCTTCC	CCCTCATCAC	CTGTGAGAGC	TCCCTGTCCG	ATGAGCCCCT	GGTGGCCATG
481	GGCTGCCTGG	CCCGGGACTT	CCTGCCCAGC	TCCGTACCTT	TCTCCTGGAA	CTACAAGAAC
541	AACAGTGTGG	TCAACAACCA				

LV3.1.36

1	TTTGTGCTGG	GCTGGGTTTT	CCTGGTTACT	CTTTTAAAAG	GTGTCCAGTG	TGACGTGCAG
61	CTGGTGAGAGT	CTGGGGGAGA	CCTGGTGAAG	CCTGGGGGGT	CTCTGAGACT	CACCTGTGTG
121	GCCTCTGGAT	TCACCTTCAG	TAGCTATAGC	ATGAAGTGGG	TCCGCCAGGC	TCCAGGGAAG
181	GGGCTGCAGT	GGGTGCGATA	TATTAGATAT	GATGGAAGTA	GCATATACTA	TGCAGACTCC
241	GTGAAGGGCC	GATTCAACGT	CTCCAGAGAC	AACGCCAAGA	ACACGCTGTC	TCTGCAGATG
301	AACAGTCTGA	AGACCGAGGA	CACGGCCACA	TATTACTGTG	CGCGCGATAG	CGACCTTGAC
361	TACTGGGGCC	AAGGAGCCCT	GGTGACGGTG	TCCTCAGAGA	CCTCATCCCG	TCCAAATCTC
421	TTCCCCCTCA	TCACCTGTGA	GAGCTCCCTG	TCCGATGAGC	CCATGGCCAC	CAGGGGCTCA
481	TCGGACAGGG	ACTTCCTGCC	CAGCTCCGTC	ACCTTCTCCT	GGAACACAA	GAACAACAGT
541	GTGGTCAACA	ACCA				

LV3.1.37

1	ATGGAGTTTG	TGCTGGGCTG	GGTGTTCTCTG	GTTGCTCTTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAC
61	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGACCTG	GTGCAGCCTG	GGGGGTCCCT	GAGACTCACC
121	TGTGTGGCCT	CTGGATTAC	CTTCAGTAGC	TATGAAATGA	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
181	GGGAAGGGGC	TGCAGTGGGT	CGCATATATA	AGTAGTGGAG	GTAGCACATA	CTACACAGAC
241	TCCGTGAAGG	GCCGATTAC	CATCTCCAGA	GACAACGCCA	AGAACACGCT	GTATCTGCAG
301	ATGAACAGCC	TCAAGACCGA	GGACACGGCC	ACATATTACT	GTGCGAGACT	GGCGATAGCG
361	ACTATGGACT	ACTGGGGCCA	AGGAGCCCTG	GTGACGGTGT	CCTCAGAGAC	CTCATCCCGT
421	CCAAATCTCT	TCCCCCTCAT	CACCTGTGAG	AGCTCCCTGT	CCGATGAGCC	CCTGGTGGCC
481	ATGGGCTGCC	TGGCCCGGGA	CTTCCTGCCC	AGCTCCGTCA	CCTTCTCCTG	GAACTACAAG
541	AACAACAGTG	TGGTCAACAA	CCA			

Cp1.1

1	TGTCTACCAG	GCATTGCTTT	CATGGGGATA	GGGGAGCTGG	GAGAGGAGCC	CCAGCCCCGG
61	GAGTCCAGG	TGTTCCATT	CTGTGATCAG	CACAGAACAC	ACACACCTCA	CCATGGAGAC
121	TGTGCTGGGC	TGGGTTTTCC	TGGTTGCTCT	TTTAAAAGGT	GTCCAGTGTG	ACGTGCAGCT
181	GGTGGAGTCT	GGGGGAGACC	TGGTGAAGCC	TGGGGGGTCT	CTGAGACTCA	CCTGTGTGGC
241	CTCTGGATTG	ACCTTCAGTA	GCTATAGCAT	GAAGTGGGTC	CGCCCTCCAG	GGGAGGGGCT
301	GCACTGGGTC	GCATACATTT	ATACTGATGG	AAGTAGCACA	AACTATGCAG	ACTCCGTGAA
361	GGGACGATTG	ACCATCTCCA	GAGACAACGG	CAAGAACACA	CTGTATCTGC	AGATGAACAG
421	CCTGAAAACC	GAGGACACGG	CCACATATTA	CTGTGTGGTA	GCGACTACCC	TCCAGGACTA
481	CTGGGGCCAA	GGAGCCCTGG	TGACGGTGTC	CTCAGAGACC	TCATCCCGTC	CAAATCTCTT
541	CCCCCTCATC	ACCTGTGAGA	GCTCCCTGTC	CGATGAGCCC	CTGGTGGCCA	TGGGCTGCCT
601	GGCCCGGGAC	TTCTGCCCCA	GCTCCGTCAC	CTTCTCCTGG	AACTACAAGA	ACAACAGTGT
661	GGTCAACAAC	A				

Cp1.2

1	GTCTACCAGG	CATTGCTTTC	ATGGGGGATA	GGGAGCTGGG	AGACGAGCCC	CAGCCCCAGA
61	AGTCCAGGT	GTTACCAGTC	TGTGATCAGC	ACAGAACACA	CACACCTCAC	CATGGAGTTT
121	GTGCTGGGCT	GGGTTTTTCT	GGTTGCTCTT	TTAAAAGGTG	TCCAGTGTGA	TGTGCAGCTG
181	TGTGAATCTG	GGGAGACCTT	GGTGAAGCCT	GGGGGGTCCC	TGAGACTCAC	CTGTGTGGCC
241	CTCGGATTCA	CCTTCAGTAG	CTATAGCATG	AACTGGGTCC	GCCAGGCTCC	AGGGAAGGGG
301	CTGCAGTGGG	TCGCATATAT	TAGTAGTAGT	GGAGGTAGCA	CAGGTTACGC	AGACTCCGTG
361	AAGGGCCGAT	TCACCATCTC	CATTGACAAC	GCCAAGAACA	CGCTGTATCT	GCAGATGGAC
421	AGCCTGAAGA	CTGAGGACAC	GGCCACATAT	TACTGTTTCG	CTATCCAGTT	TTGGGGCCAG
481	GGCACCCCTG	TCACCGTCTC	CTCAGAGACC	TCATCCCGTC	CAAATCTCTT	CCCCCTCATC
541	ACCTGTGAGA	G				

Cp1.4

1	TCACCTTCAG	TAGATATGCA	ATGACCTGGG	TCCGCCAGGC	TCCAGGGAAG	GGAAGTGCAGT
61	GGGTCTCAGC	AATTAGTGAT	AGTGGAGGTA	CCACACACTA	TGCAGACTCC	ATGAGGGGCC
121	GATTACCAT	CTCCAGAGAC	AACGCCAAGA	ACACGCTGTA	TCTGCAGATG	AACAGCCTGA
181	AGACCGAGGA	CACGGCCACA	TATTACTGTG	CGAGAGATCG	GAGTACTCAC	TATGATTACT
241	TCCAGTTTTG	GGGCCAGGGC	ACCCTGGTCA	CCGTCTCCTC	AGAGACCTCA	TCCCGTCCAA
301	ATCTCTTCCC	CCTCATCACC	TGTGAGAGCT	CCCTGTCCGA	TGAGCCCTG	GTGGCCATGG
361	GCTGCTGGC	CCGGGACTTC	CTGCCAGCT	CCGTACACCT	CTCCTGGAAC	TACAAGAACA
421	ACAGTGTGGT	CAACAACCA				

Cp1.6

1	CGGATCCAGA	ATTGCTGATT	GTCTACCAGG	CATTGCTTTC	ATGGGGGATA	GGGGAGCTGG
61	GAGACGAGCC	CCAGCCCCCA	GGAGTCCCAG	GTGTTCCCAT	TCTGTGATCG	GCACAGAACA
121	CAGACACCTC	ACCATGGAGT	TTGTGCTTGG	CTGGGTGTTC	CTCATTGCTC	TTTTAAAAGG
181	TGTCCAGTGT	GACGAGCAGC	TGGTGAGTGC	TGGGGGAGAC	CTGGTGAAGC	CTGGGGGGTC
241	CCTGAGACTC	ACCTGTATGG	CCTCCGATT	CAACGTCGGT	AGCTATGGAA	TGAGCTGGTT

Anhang

301	CCGCCAGGCT	CCAGGAAAGG	GGCTGCAGTG	GGTCACAGCA	ATTAGTGCTG	GTGGAGGTAG
361	CACAAGTTAC	GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	ATTCAACATC	TCCATTGACA	ACGCCAAGAA
421	CACACTATAT	CTGCAGATGG	ACAGCCTGAA	GACTGAGGAC	ACGGCCACAT	ATTACTGTGC
481	GAGATTCTGT	GGGCGACAAT	GGGGCGACCA	CTTCCCCTTT	TGGGGCCAGG	GCACCCCTGGT
541	CACCGTCTCC	TCAGAGACCT	CATCCCCTCC	AAATCTCTTC	CCCCTCATCA	CCTGTGAGAG
601	CTCCCTGTCC	GATGAGCCCC	TGGTGGCCAT	GGGCTGCCTG	GCCCCGGACT	TCCTGCCCGAG
661	CTCCGTCAAC	TTCTCCTGGA	ACTACAAGAA	CAACAGTGTG	GTCAACAACC	A

Cp1.8

1	GTCTACCAGG	CATTCGCTTC	ATGGGGGATA	GGGGGGGAGA	CGATCCCCAG	CCCCAGAAGT
61	CCCAGGTGTT	ACCAGTCTGT	GATCAGCACAC	GAACACACAC	ACCTAACCAT	GGAGTTTGTG
121	CTGGGCTGGG	TTTTCTGGT	TGCTCTTTTA	AAAGGTGTCC	AGTGTGATGT	GCAGCTGGTG
181	GAATCTGGGG	GAGACCTGGT	GAAGCCTGGG	GGGTCCCTGA	GACTCACCTG	TGTGGCCTCT
241	GGATTACCT	TCAGTAGCTA	TAGCATGAAC	TGGGTCCGCC	AGGCTCCAGG	GAAGGGGCTG
301	CAGTGGGTCG	CATACATTTA	TAAAGATGGA	AGTAGCACAA	GCTATGCAGA	CTCCGTGAAG
361	GGCCGATTCA	CCATCTCCAG	AGACAACGCC	AAGAACACGC	TGTATCTGCA	GATGAACAGC
421	CTGAAGACCG	AGGACACGGC	CACATATTGC	CGTGCAAAAG	CCCCTCGGGC	CAACTGTATC
481	GGGATCACGA	CGCGTCGGAA	CCCTGGTGAC	GGTGTCCTCG	GAGACCTCAT	CCCGTCCAAA
541	TCTCTTCCCC	CTCATCACCT	GTGAGAGCTC	CCTGTCCGAT	GAGCCCCTGG	TGGCCATGGG
601	CTGCCTGGCC	CGGGACTTCC	TGCCCAGCTC	CGTCACCTTC	TCCTGGAAC	ACAAGAACAA
661	CAGTGTGGTC	AACAACCA				

Cp1.9

1	GTCTACCAGG	CATTCGCTTC	ATGGGGGATA	GGGAGCTGGG	AGAGGAGCCC	CAGCCCCAGG
61	AGTCCAGGTG	TTCCCATTCT	GTGATCAGCA	CAGATCACAC	ACACACCTCA	CCATGGAGTT
121	TGTGCTGGGC	TGGGTTTTCC	TGGTTGCTCT	TTTAAAAGGT	GTCCAGTGTG	ACGTGCAGCT
181	GGTGGAGTCT	GGGGGAGACC	TGGTGAAGCC	TGGGGGGTCC	CTGAGACTCA	CCTGTGTGGC
241	CTCTGGATTG	ACCTTCAGTA	ACTACGACAT	GAAGTGGGTC	CGCCAGGCTC	CAGGGAAGGG
301	GCTGCAGTGG	GTCGCATATA	TTAATACTGA	TGGAAGTAGC	ACAAGGTACG	CAGACTCCGT
361	GAAGGGCCGA	TTCACCATTT	CCAGAGACAA	TGCCAAGAAC	ACGCTGTATC	TGCAGATGAA
421	CAGCCTCAAG	ACCGAGGACA	CGGCACATA	TTACTGTACG	AGGTGGGAAC	CTTTGTACTG
481	GGGCCACGGA	GCCCTGGTGA	CGGTGACCTC	AGAGACCTCA	TCCCCGCCAA	ATCTCTTCCC
541	CCTCATCACC	TGTGAGAGCT	CCCTGTCCGA	TGAGCCCCTG	GTGGCCATGG	GCTGCCTGGC
601	CCGGGACTTC	CTGCCCAGCT	CCGTACACCT	CTCCTGGAAC	TACAAGAACA	ACAGTGTGGT
661	CAACAACCA					

Cp1.10

1	CTACCAGGCA	TTCGCTTCAT	GGGGGATAGG	GGAGCTGGGA	GAGGAGCCCC	AGCCCCGGGA
61	GTCCAGGTG	TTCCCATTCT	GTGATCAGCA	CAGAACATAG	ACACCTCACC	ATGGAGTTTG
121	TGCTGGGCTG	GGTTTTCTCTG	GTTGCTCTTT	TAAAAGGTGT	CCAGTGTGAT	GTACAGCTGG
181	TGGAATCTGG	GGGAGACCTG	GTGAAGCCTG	GGGGGTCCCT	GAGACTCACC	TGTGTGGCCT
241	CTGGATTAC	CTTCAGTAGC	TACTACATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGGAAGGGGC
301	TGCACTGGGT	CGCACAAATT	AGTAGTAGTG	GAGGTAGCAC	ATACTACGCA	GACTCCGTGA
361	AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAACG	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG	CAGATGAACA
421	GCCTGAAGAC	CGAGGACACG	GCCACATATT	ACTGTGCGAG	GGGACCAATA	GTAGCGGGTG
481	GGCTAGAAAT	TGACTACTGG	GGCCAAGGAG	CCCTGGTGAC	GGTGTCTCTA	GAGACCTCAT
541	CCCGTCCAAA	TCTCTTCCCC	CTCATCACCT	GTGAGAGCTC	CCTGTCCGAT	GAGCCCCTGG
601	TGGCCATGGG	CTGCCTGGCC	CGGGACTTCC	TGCCCAGCTC	CGTCACCTTC	TCCTGGAAC
661	ACAAGAACAA	CAGTGTGGTC	AACAACCA			

Cp1.11

1	GTCTACCAGG	CATTCGCTTC	ATGGGGGATA	GGGGGGGAGA	GGAGCCCCAG	CCCCAGGAGT
61	CCCAGGTGTT	CCCATTCTGT	GATCAGCACAC	GAACACACAC	ACCTCACCAT	GGAGTTTGTG
121	CTGGGCTGGG	TTTTCTGGT	TACTCTTTTA	AAAGGTGTCC	AGTGTGATGT	GCAGTTGGTG
181	GAGTCTGGGG	GAGACCTGGT	GAAGCCTGGG	GGGTCCCTGA	GACTCACCTG	TGTAGCCTCT
241	GGATTACCT	TCAGTAACTA	CTACATGAGC	TGGGTCCGCC	AGGCTCCAGG	GAAGGGGCTG
301	CAGTGGGTCG	CATATATTAG	TGGTGGTGGA	GGTGACATAT	ACTACCCAGA	CTCCGTGAAG
361	GGCCGATTCA	CCATCTCTAG	AGACAACGCC	AGGAATACGC	TGTATCTGCA	GATGAACAGC
421	CTGAAGACCG	AGGACACGGC	CACATATTAC	TGTGCGACAG	ATCCTAAGTA	TGCTGACTAC
481	TGGGGCCAAG	GAGCCCTGGT	GACGGTGTCC	TCAGAGACCT	CATCCCCTCC	AAATCTCTTC
541	CCCCTCATCA	CCTGTGAGAG	CTCCCTGTCC	GATGAGCCCC	TGGTGGCCAT	GGGCTGCCTG
601	GCCCGGGACT	TCCTGCCCAG	CTCCGTCAAC	TTCTCCTGGA	ACTACAAGAA	CAACAGTGTG
661	GTCAACAACC	A				

Cp1.12

1	GTCTACCAGG	CATTCGCTTC	ATGGGGGATA	GGGGAGTGTG	TTGGGTCTCC	ATCCAGAAGA
61	CAGAAATGCA	GATGCTGTGG	TCCCTCCTCT	GCCTGCTGGC	AGCTCCCCTG	GGTGTCTTAT
121	CTCAACTTAC	ACTTCGGGAG	TCCGGCCCAG	GACTGGTGAA	GCCTTCACAA	TCCCTCTCTC
181	TCACCTGCGT	TGTCTCCGGA	GGCTCTGTTA	CCAGCAGTTA	CTACTGGAAC	TGGATCCGCC
241	AGCGCCCTGG	GAGAGGGTTG	GAGTGGCTGG	GGTACTGGTC	AGGTAGCACC	AGCTACAACC
301	CGGCTTTCCA	GGGCCGCATC	TCCATCACTG	CTGACACAGC	CCAGAACCAG	TTCTCCCTGC
361	AGCTGAGCTC	CATGACCACC	GAGGACACGG	CCGTGTATTA	CTGTGCAAGA	AGCTTGGGTA
421	TGGAGGGGTA	CTACCTCCAC	GGGGCGAACT	TTGACTACTG	GGGCCAAGGA	GCCCTGGTGA
481	CGGTGTCTCT	AGAGACCTCA	TCCCCTCCAA	ATCTCTTCCC	CCTCATCACC	TGTGAGAGCT
541	CCCTGTCCGA	TGAGCCCCTG	GTGGCCATGG	GCTGCCTGGC	CCGGGACTTC	CTGCCCAGCT
601	CCGTACACCTT	CTCCTGGAAC	TACAAGAACA	ACAGTGTGGT	CAACAACC	

Cp1.13

1	GTCTACCAGG	CATTCGCTTC	ATGGGGGATA	GGGGGGAGAG	GAGCCCCCAGC	CCCAGGAGTC
61	CAGGTGTTCC	CATTCTGTGA	TCAGCACAGA	TCACACACAC	ACCTCACCAT	GGAGTTTGTG
121	CTGGGCTGGG	TTTTCTGGT	TGCTCTTTTA	AAAGGTGTCC	AGTGTGACGT	GCAGCTGGTG
181	GAGTCTGGGG	GAGACCTGGT	GAAGCCTGGG	GGGTCCCTGA	GACTCACCTG	TGTGGCCTCT
241	GGACTCACCT	TCAGGCGCTA	CGACATGAAA	TGGGTCCGCC	AGGCTCCAGG	GAAGGGGCTG
301	CAGTGGGTCG	CATATATTGA	CACTGATGGA	ACTAGCACAA	GCTACGTAGA	CTCCGTGAAG
361	GGCCGATTCA	CCATCTCCAG	AGACAACGCC	AAGAACACGC	TGTATCTGCA	GATGAACAGC
421	CTGAAGACCG	AGGACACGGC	CACATATTAC	TGTGCGACCC	AAGTAGCGGG	TGGCCCCCGC
481	TACTGGGGCC	AAGGAGCCCT	GGTGACGGTG	TCCTCAGAGA	CCTCATCCCG	TCCAAATCTC
541	TTCCCCCTCA	TCACCTGTGA	GAGCTCCCTG	TCCGATGAGC	CCCTGGTGGC	CATGGGCTGC
601	CTGGCCCCGG	ACTTCTTGCC	CAGCTCCGTC	ACCTTCTCCT	GGAACACAA	GAACAACAGT
661	GTGTTCAACA	ACCA				

8.12 Sequenz der bei der Untersuchung von Fall T1528/07

aufgetretenen Nebenbande

1	GTGGCCTCTG	GATTACACCTT	CAGTAGCTAC	TACATGAGCT	GGGTCCGCCA	GGCTCCAGGG
61	AAGGGGCTGC	AGTGGGTCGC	ATATATTAGT	AGTAGTGGAG	GTAGCATATA	CTACGCAGAC
121	TCCGTGAAGG	GCCGATTAC	CATCTCCAGA	GACAACGCCA	AGAACACGCT	GTATCTGCAG
181	ATGAACAGCC	TGAAGACCGA	GGACACGGCC	ACATATTACT	GTGCTCGGGG	GGTCCCAGATG
241	GACTCCTGGG	GCCAAGGAGC	CCTGGTGACG	GTGTCCTCAG	GTGAGTCCTC	CCGGCTTTCC
301	TCTCCTCTCT	CTGTCGGGAG	GTTTTGGCTG	CATTTGGGGA	GAAAACGGAG	GGTGCCAGGG
361	TCTCGGACCT	AGGGCTGGCT	TGGTGGCCAG	GCTCTCCGGG	GACCTCAGCC	ACCCTCAGCT
421	TCAGGGGCCA	CCTGGTCCTC	TCAGCCTCAC	TGGCTGTGAT	CTGAGGTGGA	CCGAGGCCTT
481	AGCCAGGCCC	CACTTCTTGT	CTGGGGCCCC	ACCAACATTG	TCACAATGTG	ACAACTGGTT
541	CAACTACTGG	GGCCACGGAA	CCCT			

8.13 Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme, Kits und Antikörper

Biozym, Oldendorf (Vertreter von Gentra Inc., Mineapolis MN, USA)

Puregene[®] Kit, Kat.-Nr.: 202005

Purescript[®] Kit, Kat.-Nr.: 212010

SeaKem[®] LE Agarose, Kat.-Nr.: 840.00

BD Biosciences Heidelberg, Palo Alto, CA, USA

SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit, Kat.-Nr. 632914

BioCat, Heidelberg (Vertreter von Seegene, Kangnam-gu Seoul, Korea und von Finnzymes, Espoo Finland)

CapFishing[™] Full-lengt cDNA Premix Kit, Kat.-Nr. E1030-SG

Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymerase Kit, Kat.-Nr. F-553S

Bio-Rad Laboratories GmbH

Chelex 100 Resin, Kat.-Nr.: 142-1253

Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada

Anti-Mouse CD45R (Ly 5, B220), Purified (Clone RA3-6B2), Kat.-Nr.: CL8990AP

Dako, Hamburg

CD3, Polyclonal, Rabbit Anti-Human, Kat.-Nr.: A0452

Invitrogen, Karlsruhe

Superscript[™] II Reverse Transkriptase, Kat.-Nr. 18064-022

Library Efficiency[®] DH5 α [™] Competent Cells, Kat.-Nr.: 18263-012

TOPO TA Cloning[®] Kit, Kat.-Nr.: 12355-038

Macherey & Nagel, Düren

NucleoSpin[®] Extract II, Kat.-Nr.: 740590.250

NucleoSpin[®] Plasmid, Kat.-Nr.: 740588.250

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

*Eco*RI, Kat.-Nr.: ER0271

*Hin*FI, Kat.-Nr.: ER0801

pUC19 DNS, Kat.-Nr.: SD0061

*Rsa*I, Kat.-Nr.: ER1121

6X Orange Loading Dye Solution, Kat.-Nr.: R0631

Natutec, Frankfurt

BioTherm™ DNS-Polymerase, Kat.-Nr.: GC-002-002

Novagen-Merck Biosciences GmbH, Darmstadt

AccepTor™ Vector Kit, Kat.-Nr.: 70595-4

peQLab, Erlangen

dNTP-Set “Long Range”, Kat.-Nr.: 20-2110

dNTP-Set, Kat.-Nr.: 20-2011

peQGOLD AMV, Reverse Transkriptase, Kat.-Nr.: 03-1010

SAWADY Taq-DNS-Polymerase, Kat. Nr.: 01-1030

Promega, Mannheim

RNAasin®, Ribonuclease Inhibitor, Kat.-Nr.: N2111

Qiagen, Hilden

Oligotex® Direct mRNA Kit, Kat.-Nr.: 70022

QIAshredder®-Säulen, Kat.-Nr.: 79654

QIAGEN® Multiplex PCR Kit, Kat.-Nr.: 206143

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

2-Propanol, Rotipuran® p. a., Kat.-Nr.: 6752.2

Ampicillin Natriumsalz, Kat.-Nr.: KO29.1

Ammoniumperoxodisulfat ≥ 98 %, p.a., Kat.-Nr.: 9592.3

Borsäure p. a., Kat.-Nr.: 6943.3

Bromphenolblau, Kat.-Nr.: A512.1

DEPC ≥ 97 %, Kat.-Nr.: K028.1

EDTA-Dinatrium-Dihydrat p. a., Kat.-Nr.: 8043.1

Ethanol, Rotipuran® p. a., Kat.-Nr.: 9065.4

Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10mg/ml): Kat.-Nr.: 2218.2

IPTG, Kat.-Nr.: 2316.2

LB-AGAR (Luria Miller), Kat.-Nr.: X969.2

LB-Medium (Luria Miller), Kat.-Nr.: X968.2

Natriumacetat p. a., Kat.-Nr.: 6773.2

Natriumdodekylsulfat, Kat.-Nr.: 2326.2

Roti[®] Chlorophorm/Isoamylalkohol, Kat.-Nr.: X984.1

Roti[®] Phenol, Kat.-Nr.: 0038.1

Rotiphorese[®] Gel 40 (19:1), Kat.-Nr.: 3030.1

TEMED 99 %, p.a., für die Elektrophorese, Kat.-Nr.: 2367.3

Tris-Puffer Ultra Pure, Kat.-Nr.: 5429.2

X-Gal, Kat.-Nr.: 2315.3

Xylenzyanol, Kat.-Nr.: C.I. 42135

Serva, Heidelberg

Ficoll[®] 400, Kat.-Nr.: 39763.02

Silicone Solution SERVA, Kat.-Nr.: 35130

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tween[®] 20, Kat.-Nr.: P9416

8.14 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

Assab Medizin AB, Stockholm, Schweden

Brutschrank 77.09 615A 303 GF

Balzer GmbH

Monofile Schnur, Kat.-Nr: 12062/030

Biometra, Göttingen

BioDoc Analyse Geldokumentation System

Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf

Multicycler PTC 200

Multicycler PTC 200 Gradient

PCR Soft Tubes, 0,5 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710911

PCR Soft Tubes, 0,2 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710920

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 1000 µl: Kat.-Nr.: 781002

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 200 µl: Kat.-Nr.: 780202

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 100 µl: Kat.-Nr.: 780102

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 20 µl: Kat.-Nr.: 780022

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 10 µl: Kat.-Nr.: 780017

Consort, Belgien

Microcomputer Electrophoresis Power Supply

Eastman Kodak Inc., USA

Kodak Gel-Dokumentation System Version 1.0

Eppendorf GmbH, Hamburg

Eppendorfzentrifuge 5415C

Haereus, Hanau

Zentrifuge-Labofuge 400R

H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim

Varioklav[®] Dampfsterilisator Typ 500 EV

Janke & Kunkel GmbH & Co KG JKA Labortechnik, Stauffen

Schüttler HS501D

Keutz, Reiskirchen

Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“, horizontal, Kat.-Nr.: 0030191-00

Gießvorrichtung, Kat.-Nr.: 0030191-03

KNF Neuberger GmbH, Freiburg

Membran-Vakuumpumpe, Kat.-Nr.: N 035AN.18

MAGV, Rabenau

Falcon™ Rundboden-Röhrchen, Kat.-Nr.: 352059

1mal Petrischalen, ohne Nocken, Kat.-Nr.: 632180

Mettler GmbH, Giessen

Präzisionswaage PM 4600 Delta Range

Präzisionswaage AE100

MICROM GmbH, Walldorf

Mikrotom Microm HM 335 E

Privileg, Quelle, Gießen

Mikrowellengerät 7020

Radeberger Bilderrahmen GmbH, Radeberg

21 cm x 29,7 cm (DIN A4) Rahmenloser Bildhalter Normalglas, Kat.-Nr.: 300450

Reichert-Jung, Nußloch

Kryomikrotom Frigocut 2.700

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Saugflasche, Erlenmeyerform, Kat.-Nr.: E576.1

Shimadzu Europa GmbH, Duisburg

Shimadzu UV-1202, UV-VIS Spektrophotometer

Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich

UV-Transluminator 312 nm

UV-Transluminator 254 nm

Horst Zaun, Königswinter (Oberpleis)

Semperguard, Latex puderfrei, Kat.-Nr.: 8247 0482

Semperguard, Nitril USH puderfrei, Kat.-Nr.: 8106 02082

8.15 Lösungen und Puffer

Die folgend aufgeführten Lösungen und Puffer wurden, soweit angegeben, bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert.

8.15.1 PCR

8.15.1.1 DEPC-Wasser – RNase-freies Wasser

1 ml Diethylpyrocarbonat gibt man zu 1l Aqua dest.. Über Nacht auf Magnetrührer inkubieren. Danach autoklavieren.

8.15.2 Elektrophorese

8.15.2.1 10 × TBE-Puffer

108,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

55,0 g Borsäure (MW 61,83)

8,3 g EDTA-Na₂ (MW 372,24)

ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

8.15.2.2 40 × TAE-Puffer

193,6 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

108,8 g Na-Acetat (MW 82,03)

15,2 g EDTA-Na₂ (MW 372,24)

ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

8.15.2.3 0,5 × T-Puffer

60,57 mg Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

ad 100 ml Aqua dest., autoklavieren

8.15.2.4 15%ige Ficoll®-Lösung zum Beladen der Geltaschen

1,5 g Ficoll® 400

ad 10 ml Aqua dest.,

Schütteln bis zur vollständigen Auflösung.

Zugabe von 25 mg Xylenzyanol oder 25 mg Bromphenolblau

8.15.2.5 2%ige und 3 %ige Agarosegele

100 ml 1×TBE (10 ml 10×TBE und 90 ml Aqua dest.)

2 g bzw. 3 g Agarose

Die Agarose in 1×TBE Puffer in der Mikrowelle aufkochen bis zur vollständigen Auflösung.

Auf ca. 60 °C abkühlen lassen und 8 µl 0,1%ige Ethidiumbromidlösung zufügen. Gel

blasenfrei in Gießvorrichtung mit einem oder zwei Kämmen (20 Zähne) gießen. Nach dem

Erstarren des Gels die Kämmen entfernen.

8.15.2.6 Glasplatten silanisieren

Zu silanisierende Oberflächen gründlich reinigen, als letzten Reinigungsschritt mit dest.

Wasser abspülen. 20 µl 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat-Lösung und 150 µl 10%ige

Essigsäure in ein Falcon-Tube geben und auf 5 ml mit absolutem Ethanol auffüllen.

Oberflächen gründlich mit dieser Lösung beschichten (Lösung auftropfen und mit Papiertuch

verreiben). Trocknen lassen. Etwas Diethylether auftropfen und Oberfläche damit polieren.

Zwei- bis dreimal wiederholen. Etwas abs. Ethanol auftropfen und Oberfläche damit polieren.

Zwei- bis dreimal wiederholen. Trocknen lassen.

8.15.3 Klonierung

8.15.3.1 LB Medium

25 g Fertigmedium

ad 1000 ml Aqua dest.

Autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen lassen und 100µg/ml Ampicillin hinzufügen. Bis zur

Verwendung bei 4°C lagern.

8.15.3.2 LB Agar

40 g Fertigmedium

ad 1000 ml Aqua dest.

Autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen lassen und 100 µg/ml Ampicillin hinzufügen. In sterile Petrischalen gießen, erstarren lassen und anschließend bei 4°C lagern.

9 Abkürzungsverzeichnis

(Amp)	Schwache Amplifikation
A	Adenin
Amp	Amplifikation
AMV	Avian Myeloblastoma Virus
B3q26	Langer Arm des Chromosom 3, Region 2, Band 6
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2 (Protein)
BKH	British Kurzhaar
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CDR	complimentary-determining region
C-Region	constant region
D	diversity
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMFO	Dimethyformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKH	Europäisch Kurzhaar
FeLV	Felines Leukämievirus

FFPE	Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe
FIV	Felines Immundefizienzvirus
FR	framework region
G	Guanin
G6PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
Ig	Immunglobulin
IgH	immunoglobulin heavy (chain), schwere Kette des Immunglobulins
IGHG	immunoglobulin heavy gamma-chain gene
IGHM	immunoglobulin heavy μ -chain gene
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	joining
k.a.	keine Angabe
kAmp	Keine Amplifikation
kD	Kilodalton
L	Leipzig
LTR	long terminal repeat
m	männlich
MALT	mucosa-associated lymphatic tissue
mk	männlich, kastriert
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-RNS)
N	non templated encoded
NK	Natürliche Killerzellen
OH	Hydroxylgruppe
P	pallindromische Nukleotide

PCR	polymerase chain reaction
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
poly A	Polyadenyliert
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RAG	recombination activating gene
REAL	revised european american lymphoma classification
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RSS	recombination signal sequences
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodekylsulfat
SMART	switch mechanism at 5' end of RNA transcript
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-cell receptor
TdT	Terminale Desoxynukleotidtransferase
UPL	langer Universalprimer
UPM	Mischung aus kurzem und langen Universalprimer
UPS	kurzer Universalprimer
UV	Ultraviolett
V	variable
VH	V-Region der schweren (heavy) Kette des Immunglobulins
VNTR	variable numbers of tandem repeats

w	weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation der Vereinten Nationen
wk	weiblich, kastriert
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. M. Reinacher für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Dr. Werner Hecht für die vielen produktiven Diskussionen, Vorschläge und seine unerschöpfliche Geduld bei Fragen des molekularbiologischen Laien.

Herrn Alexander Weiss für die unbezahlbare Hilfe zu Beginn der Arbeit, aber auch für die Unterstützung bis zuletzt.

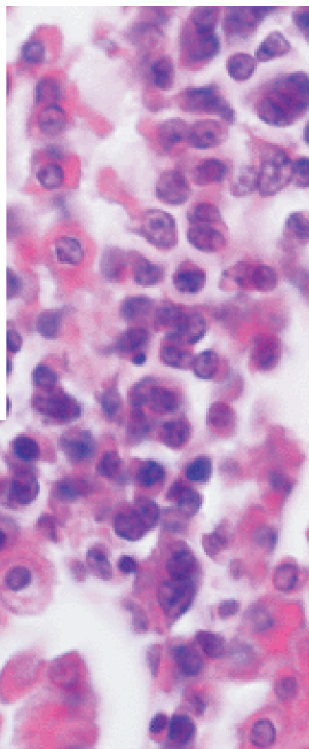
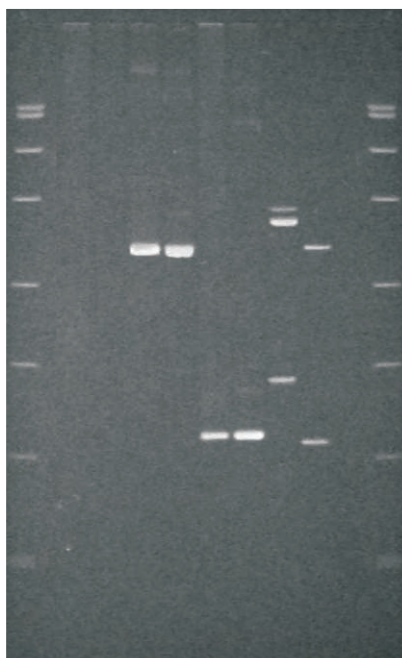
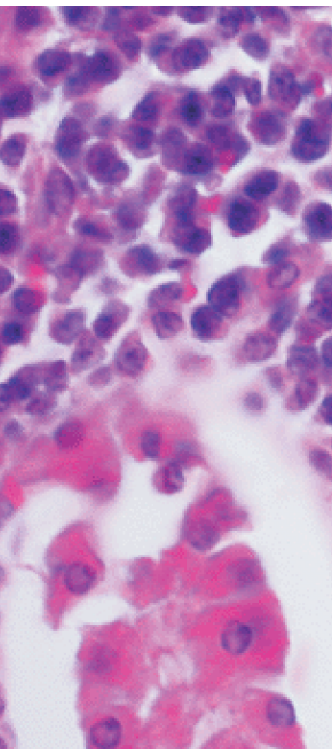
Herrn Dr. Kernt Köhler für die Überlassung der Lymphomproben einschließlich ihrer Klassifizierung, sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie, die bei der Anfertigung und Diagnose der histologischen und immunhistologischen Proben aus der Routinediagnostik beteiligt waren.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Silke Engel für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie insbesondere bei Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, meinen Schwiegereltern und vor allem Estelle.

Das Dissertationsprojekt wurde unterstützt durch ein Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
 STAUFENBERGRING 15
 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
 redaktion@doktorverlag.de
 www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5276-5



9 783595 2768